



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOPAN**

**Campus Loma Bonita**

---

**LICENCIATURA EN ZOOTECNIA**

**FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL  
GEN KAPPA CASEÍNA EN BOVINOS DE DOBLE**

**PROPÓSITO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN ZOOTECNIA**

**PRESENTA:**

**NOHEMÍ GABRIELA CORTÉS LÓPEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ ABAD ZAVALETA**

**CO-DIRECTOR DE TESIS: DRA. SANDRA TRINIDAD DEL MORAL  
VENTURA**



# **UNIVERSIDAD DEL PAPALOPAN**

## **LICENCIATURA EN ZOOTECNIA**

LA PRESENTE TESIS TITULADA “FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL GEN KAPPA CASEÍNA EN BOVINOS DE DOBLE PROPÓSITO”. PRESENTADA POR LA PASANTE NOHEMÍ GABRIELA CORTÉS LÓPEZ BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JOSÉ ABAD ZA VALETA, HA SIDO REVISADA Y ACEPTADA POR EL JURADO EXAMINADOR PARA SER DEFENDIDA EN EL EXAMEN PROFESIONAL Y OBTENER EL TITULO DE LICENCIADA EN ZOOTECNIA.

### **JURADO EXAMINADOR**

---

Dr. José Abad Zavaleta  
Director de tesis

---

Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura  
Co-Director de tesis

---

Dr. Enrique Villalobos Amador  
Revisor

LOMA BONITA, OAXACA, JUNIO DE 2011

## DEDICATORIA

*Esta tesis la dedico primeramente a Dios por haberme creado, llenado de bendiciones y darme sabiduría y paciencia para poder culminar un logro más en mi vida.*

*A mis padres Gloria y Fortino y a mi hermano Alejandro por haberme apoyado en todo momento.*

*A todos mis amigos por animarme a seguir adelante y ser mi apoyo moral en los momentos más difíciles.*

*A mis asesores, el Dr. José Abad y la Dra. Sandra del Moral por su apoyo y paciencia, porque dedicaron su tiempo en resolver un problema importante en la producción de ganado bovino de doble propósito, el cual servirá de referencia para continuar con esta línea de investigación.*

*Hijo mío, está atento a mi sabiduría, y a mi inteligencia inclina tu oído, para que guardes consejo, y tus labios conserven la ciencia. Proverbios 5:1-2*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la vida, sabiduría e inteligencia y guiarme a hacer lo recto ante sus ojos.

A mis padres y a mi hermano por estar a mi lado siempre, por sus consejos y por su apoyo económico.

A todos mis amigos por animarme en los momentos más difíciles y por ser de bendición en mi vida.

A la Universidad del Papaloapan por haberme formado como profesional y por permitirme lograr un triunfo más en la vida.

A mis profesores por haber dedicado su tiempo en enseñarme y proveerme de sus conocimientos para ser una buena profesionista.

A los productores de ganado bovino de doble propósito por permitirnos ocupar sus animales para este estudio, ya que este trabajo está dirigido a mejorar su producción.

A PROMEP por haber financiado el proyecto, con clave PROMEP/103.5/07/2740.

A la Lic. Jennie Renn por haberme ayudado en la traducción.

A cada una de las personas que directa o indirectamente hicieron posible este trabajo.

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<i>vii</i>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<i>viii</i>
<b>ANEXOS</b> .....	<i>ix</i>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<i>x</i>
<b>RESUMEN</b> .....	<i>xi</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xii</i>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<i>1</i>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<i>4</i>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<i>4</i>
<b>4. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<i>5</i>
4.1. Generalidades de los bovinos .....	<i>5</i>
4.2. Ganadería en México .....	<i>5</i>
4.3. Producción lechera en México y en la cuenca del Papaloapan .....	<i>6</i>
4.4. Características del ganado de doble propósito .....	<i>8</i>
4.5. Características biológicas y químicas de la leche .....	<i>9</i>
4.6. Factores que afectan la composición y la producción de la leche ..	<i>11</i>
4.6.1. Factores genéticos .....	<i>11</i>
4.6.2. Factores fisiológicos .....	<i>13</i>
4.6.3. Alimentación .....	<i>14</i>
4.6.4. Velocidad de ordeño .....	<i>14</i>
4.6.5. Estación del año .....	<i>15</i>

4.7. Composición del queso (características fisicoquímicas).....	16
4.8. Herramientas moleculares en la genotipificación .....	18
4.8.1. Marcadores moleculares .....	18
4.8.1.1. Microsatélites .....	19
4.8.1.2. RFLP .....	20
4.8.1.3. PCR-RFLP .....	21
4.9. Estudios genéticos en ganado bovino sobre la calidad de la leche.	21
4.9.1. Estudios del gen <i>CAS<math>\kappa</math></i> en bovinos .....	23
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
5.1. Localización geográfica .....	25
5.2. Toma de muestras de sangre .....	25
5.3. Extracción de ADN .....	25
5.4. Amplificación del ADN .....	26
5.5. Electroforesis de ADN .....	27
5.6. Genotipificación .....	27
5.7. Análisis estadístico .....	28
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>36</b>
<b>9. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>37</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Sistemas de producción de leche en México .....	7
Tabla 2. Porcentaje promedio de proteína en leche de diversas razas de ganado bovino.....	12
Tabla 3. Variantes alélicas del gen <i>CAS<math>\kappa</math></i> .....	17
Tabla 4. Reacción de amplificación de ADN .....	26
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para amplificar ADN de bovinos de doble propósito.....	26
Tabla 6. Programa de amplificación de los fragmentos de ADN bovino .....	27
Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas en bovinos de doble propósito .....	30
Tabla 8. Frecuencias alélicas de <i>CAS<math>\kappa</math></i> de algunas razas de bovinos productores de leche .....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Formación y organización de micelas estabilizadas por $\text{Ca}^{++}$ y caseínas ( $\alpha_1$ , $\alpha_2$ , $\beta$ , $\kappa$ ) en leche .....	11
Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la $\kappa$ -CN en bovinos .....	17
Figura 3. Patrón de restricción del marcador MB002 utilizando <i>Hinf I</i> .....	28
Figura 4. Genotipificación del gen $\text{CAS}_\kappa$ en bovinos de doble propósito con electroforesis en un gel de agarosa el 3% .....	29
Figura 5. Regiones exónicas e intrónicas del gen $\text{CAS}_\kappa$ .....	31

## ANEXOS

	Pág.
<b>ANEXO 1. MANUAL DEL KIT DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....</b>	46
<b>ANEXO 2. SECUENCIA DEL GEN CAS<math>\kappa</math>.....</b>	50
<b>ANEXO 3. “ALLELIC AND GENOTYPIC FRECUENCY TO CASEINA KAPPA GENE IN DOUBLE PURPOSE IN BOVINES”.....</b>	55

## ABREVIATURAS

**$\alpha$ -La:**  $\alpha$ -lactoalbúmina

**$\alpha$ s1-Cn:**  $\alpha$ -s1 caseína

**$\alpha$ s2-Cn:**  $\alpha$ -s2 caseína

**$\beta$ -Cn:**  $\beta$ -caseína

**$\beta$ -Lg:**  $\beta$ -lactoglobulina

**$\kappa$ -CN:**  $\kappa$ -caseína

**CAS $\kappa$  :** Gen que codifica para la  $\kappa$ -CN

**CAS $\kappa$  AA:** Genotipo AA del gen CAS $\kappa$  (Homocigoto dominante)

**CAS $\kappa$  BB:** Genotipo BB del gen CAS $\kappa$  (Homocigoto recesivo)

**CAS $\kappa$  AB:** Genotipo AB del gen CAS $\kappa$  (Heterocigoto)

**kb:** kilobases

**pb:** pares de bases

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

**RFLP:** Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción de ADN  
(Restriction Fragment Length Polymorphism)

**PCR-RFLP:** Reacción en cadena de la polimerasa – polimorfismos en la  
longitud de fragmentos de restricción de ADN.

## RESUMEN

### FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL GEN KAPPA CASEÍNA EN BOVINOS DE DOBLE PROPÓSITO

Con el objetivo de determinar las frecuencias alélicas del gen  $CAS\kappa$  en bovinos de doble propósito y generar recomendaciones prácticas sobre selección de individuos homocigotos para la variante deseable B, se tomaron muestras de plasma sanguíneo a 200 bovinos de doble propósito. A partir del material genético extraído, se amplificó el marcador MB002. Las pruebas de RFLP's se realizaron utilizando la enzima de restricción *Hinf I* para el diagnóstico de los alelos A y B del gen  $CAS\kappa$ . Las frecuencias genotípicas obtenidas correspondieron a 0.34, 0.01 y 0.65 para los homocigotos AA, BB, y para el heterocigoto AB, respectivamente. Las frecuencias alélicas fueron 0.67 y 0.34 para el alelo A y B, respectivamente. Asimismo, se observa una heterocigosidad media de 0.6481. La población en estudio no se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg, el valor de  $\chi^2$  fue 21.93 con dos grados de libertad (P=0.999).

**Palabras clave:** Bovinos de doble propósito, frecuencias genotípicas,  $CAS\kappa BB$

## ABSTRACT

### “ALLELIC AND GENOTYPIC FRECUENCIES TO CASEINA KAPPA GENE IN IN DOUBLE PURPOSE BOVINES”

With the objective of determining the gene allele frequencies  $CAS_{\kappa}$  in double purpose bovines and generate practical recommendations on selection of individuals homozygous for the desirable variant B, samples of blood plasma to were extracted from 200 double purpose bovines. From the extracted genetic material marker MB002 was amplified. RFLP tests were performed using the restriction enzyme *Hinf I* to diagnosis alleles A and B gene  $CAS_{\kappa}$ . The genotype frequencies obtained were found to be 0.34, 0.01 and 0.65 for homozygotes AA, BB and heterozygous AB, respectively. The allele frequencies were 0.67 and 0.34 for alleles A and B, respectively. Also, there is an average heterozygosity of 0.6481. The population studied is not found to be in Hardy Weinberg equilibrium, the  $\chi^2$  value was 21.93 with two degrees of freedom (P=0.999).

**Keywords:** Double purpose bovines, genotype frequencies,  $CAS_{\kappa}$  BB

## 1. INTRODUCCIÓN

La leche es un fluido biológico complejo, cuya función es asegurar el desarrollo adecuado de los mamíferos en su primera etapa de vida. Para que la leche sea asimilada correctamente por la cría de los bovinos se coagula en el abomaso del becerro por la acción de enzimas proteolíticas como la pepsina y la quimosina, siendo este fenómeno la base de la producción del queso (López y Vásquez, 2004; Alexander *et al.*, 1988). La producción de leche de bovino en México juega un papel fundamental dentro de la economía del sector primario e industrial. En el país, la producción de leche se realiza en cuatro sistemas: el sistema especializado, el sistema semiespecializado, el sistema de doble propósito y el sistema familiar. En el estado de Oaxaca se utiliza principalmente el sistema de doble propósito y produce 145 213 L de leche y 78 331 ton de carne de este sistema, de los cuales 24 503 L (16.8%) de leche y 19 714 ton (25.2%) de carne se producen en la región del Papaloapan (INEGI, 2008; Gallardo *et al.*, 2004).

La leche contiene carbohidratos, lípidos, proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales, vitaminas, elementos inorgánicos y agua. Tiene diferentes funciones fisiológicas como proporcionar nutrientes a las crías de los mamíferos en su primera etapa de vida, proteger el tracto gastrointestinal de las crías contra patógenos, toxinas e inflamación y contribuye a la salud metabólica regulando los procesos de obtención de energía, en especial el metabolismo de la glucosa y la insulina, las cuales se llevan a cabo por proteínas y péptidos. Las proteínas lácteas están divididas en la fracción soluble

(proteínas del suero), como la  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La) y la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg); y la fracción insoluble (caseínas totales): la  $\alpha$ -s1 caseína ( $\alpha$ s1-Cn), la  $\alpha$ -s2 caseína ( $\alpha$ s2-Cn), la  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -Cn) y la  $\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -CN). Las caseínas se encargan de retener la grasa en la leche formando una emulsión. La  $\kappa$ -CN es importante en el rendimiento quesero debido a su participación en la estabilización de la formación de micelas, previniendo la precipitación de las caseínas de la leche (Thompson *et al.*, 2009; Formaggioni *et al.*, 1999; Threadgill y Womack, 1990).

Todas las caseínas presentan un polimorfismo genético que consiste en la sustitución de uno o dos aminoácidos y rara vez la supresión de un segmento. La variante o variantes presentes en la leche están determinadas por la genética mendeliana. La presencia de determinadas variantes genéticas en la leche tiene un efecto importante sobre las propiedades queseras de la misma (Corral *et al.* 2006; Fox *et al.* 2000; Gutiérrez *et al.* 2000; Formaggioni *et al.* 1999; Freyer *et al.* 1999; Threadgill y Womack, 1990).

Las caseínas están codificadas por un grupo de genes autosómicos que se encuentran ubicados en la posición 6q31-33 del cromosoma 6 con un tamaño de 250 kb, (Requena y Agüera, 2007; Corral *et al.*, 2006; Fox *et al.*, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2000; Formaggioni *et al.*, 1999; Freyer *et al.*, 1999; Threadgill y Womack, 1990).

En bovinos de razas lecheras europeas (*Bos taurus*) se han descrito 6 variantes alélicas A, B, C, E, F y G del gen de la kappa caseína ( $CAS\kappa$ ) (Requena y Agüera, 2007; Barroso *et al.*, 1998; Horne y Muir, 1994). La leche derivada de *Bos taurus* con la variante alélica B del gen  $CAS\kappa$  presenta mayor proporción de  $\kappa$ -CN, micelas pequeñas, un contenido proteico más alto, mayor estabilidad al calor y a la congelación, menor tiempo de coagulación, un cuajo más consistente, por lo tanto un mayor rendimiento quesero (5 a 10%), en comparación con la leche de los animales que presentan la variante alélica A del gen  $CAS\kappa$  (Requena y Agüera, 2007). En México los estudios de genotipificación son muy escasos en bovinos de doble propósito (*Bos taurus* x *Bos indicus*), razón por la cual, es importante determinar las frecuencias alélicas del gen  $CAS\kappa$  y generar recomendaciones prácticas sobre el manejo y selección de individuos genéticamente superiores en la región del Papaloapan.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Determinar las frecuencias alélicas del gen  $CAS\kappa$  en bovinos de doble propósito y generar recomendaciones prácticas sobre la selección de individuos homocigotos para la variante deseable B.

### 2.2. Objetivos particulares

- Seleccionar a bovinos de doble propósito en la región del Papaloapan de acuerdo a su raza.
- Amplificar el marcador MB002 del gen  $CAS\kappa$  de los bovinos seleccionados.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del gen  $CAS\kappa$  de las variantes A y B de la población seleccionada.
- Generar recomendaciones prácticas sobre el manejo de individuos con la variante deseable B.

## 3. HIPÓTESIS

Los bovinos de doble propósito tienen ascendencia de *Bos taurus*, por lo tanto en la población analizada se encontrarán los genotipos de  $CAS\kappa$  AA, AB o BB.

## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Generalidades de los bovinos

El ganado vacuno perteneciente al Género *Bos* fue domesticado por el hombre como animal de trabajo durante el período Neolítico en Europa y Asia, evolucionando como especie dedicada a usos más complejos. Las diferentes razas europeas de *Bos taurus* y las que tienen su origen en Asia *Bos indicus*, se difundieron en todo el mundo para aprovechar su producción de carne y leche (ASERCA, 1995).

### 4.2. Ganadería en México

El ganado bovino criollo que llegó a México hace 500 años, se encuentra en todo el territorio mexicano (ASERCA, 1995). Las primeras 50 cabezas de ganado fueron introducidas por Gregorio Villalobos, durante la época de la Nueva España, en 1521, alcanzando con rapidez su desarrollo y multiplicación por las condiciones naturales favorables que ofrecía el nuevo territorio (Gallardo *et al.*, 2004; Suárez y López, 1996).

Desde ese momento y hasta finales del siglo XIX, este ganado de origen español prevaleció como única raza existente. En 1896 se realizaron las primeras importaciones de ganado especializado para la producción de carne (Hereford y Pardo Suizo Europeo) en la región norte de México. En 1925 arribó a México el ganado Angus y entre 1929 y 1930 fueron importados los primeros bovinos de la raza Charolais (Suárez y López, 1996).

Los esquemas productivos y comerciales que provocaron un crecimiento importante de la ganadería extensiva de 1542 a 1810, fueron básicamente la existencia de grandes extensiones de explotaciones ganaderas, que se establecían cerca de las ciudades, con el fin de proporcionar el suministro de alimento a la población. En la actualidad, la cría y explotación de ganado bovino en México, mantiene su base en la ganadería de pastoreo, como sistema tradicional y dominante, mejor conocida como ganadería extensiva, la nutrición del ganado se realiza en pastizales nativos o agostaderos naturales, y los recursos existentes en ellos, cuya disponibilidad durante el año mantiene una relación directa y excesivamente dependiente de las condiciones climatológicas estacionales (Gallardo *et al.*, 2004; ASERCA, 1995), tal es el caso del ganado de doble propósito que la base de su alimentación son los pastos nativos de los agostaderos de la región.

#### **4.3. Producción lechera en México y en la cuenca del Papaloapan**

La producción de leche de bovino en México, es una de las ramas de la ganadería de mayor relevancia porque juega un papel fundamental dentro de la economía del sector primario e industrial. En el año 2006, la producción de leche ascendió a 10,029 millones de litros, con un crecimiento de 1.6% respecto al año anterior. En el país, la producción de leche se realiza en cuatro sistemas: el especializado, el semiespecializado, el de doble propósito y el familiar, abarcando el 50.6, 21.3, 18.3 y 9.8% de la producción respectivamente (tabla 1); de los cuales, en las zonas productoras de leche en el estado de Oaxaca, se

utiliza el sistema de doble propósito. En la región del Papaloapan del estado de Oaxaca se produce el 25.2% (19 714 ton) de carne y 16.8% (24 503 L) de leche de ganado bovino, siendo la principal región productora de leche del estado (INEGI 2008; Gallardo *et al.*, 2004).

Tabla 1. Sistemas de producción de leche en México

Sistema	Raza	Tecnología	Manejo	Alimentación
Especializado	Holstein Jersey Pardo suizo americano	Ordeña mecanizada	Estabulado	Forrajes de corte Alimento balanceado
Semi-especializado	Holstein Jersey Pardo suizo americano	La ordeña se realiza de forma manual, con ordeñas individuales o de pocas unidades. Se carece de equipo para el enfriamiento y conservación de la leche	Semi-estabulación y en pequeñas extensiones de terreno	Forrajes de corte Alimento balanceado
Doble propósito	Cebuinas y sus cruzas	La ordeña se realiza de forma manual, con ordeñas individuales. Se carece de equipo para el enfriamiento y conservación de la leche	Generalmente extensiva y en pequeñas extensiones de terreno	Pastoreo con un mínimo de suplementación alimenticia. Ocasionalmente se emplean subproductos agrícolas
Familiar o traspatio	Holstein Suizo americano Cruzas	Ordeña manual	Cerca de la vivienda y extensiones pequeñas. Semi-estabulado	Pastoreo y suministros de desechos agrícolas provenientes de cultivos

#### **4.4. Características del ganado de doble propósito**

El sistema de ganadería de doble propósito es un término que ha sido usado para describir el sistema de producción de ganadería bovina en las tierras bajas de América Latina. En este sistema, el ganado local es el producto del cruce de Cebú, Criollo y razas europeas productoras de leche y carne, caracterizado por producir carne y leche en áreas tropicales, combinando el ordeño con el amamantamiento de los becerros hasta el destete y requiere de bajos insumos con escaso uso de tecnología. Generalmente, este sistema ha sido considerado como ineficiente debido a que sus índices de productividad parcial, comparados con los sistemas intensivos de producción de leche utilizados en los países desarrollados (Ortega y Ward, 2005; Báez 2000).

En México, el sistema de doble propósito cobra especial importancia ya que el área tropical abarca 51.3 millones de hectáreas, equivalentes al 26.2% del territorio nacional. De esta superficie, 19 millones de hectáreas se dedican a la producción pecuaria, donde pastorean aproximadamente 12 millones de bovinos (40% del inventario nacional), que producen el 28 y 39% de la leche y carne, respectivamente, que se consumen en México. Este tipo de ganadería se realiza principalmente en sistemas de pastoreo y la producción láctea se utiliza en la elaboración de quesos, para venta directa al consumidor o a empresas (Báez, 2000).

#### **4.5. Características biológicas y químicas de la leche**

La leche de bovino contiene principalmente agua, lípidos, lactosa, proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales, vitaminas y elementos inorgánicos (Thompson *et al.*, 2009; Walstra *et al.*, 1999; Goff y Hill, 1993; González de Llano, 1990). Tiene diferentes funciones fisiológicas, como proporcionar nutrientes a las crías de los mamíferos en su primera etapa de vida, proteger el tracto gastrointestinal de las crías contra patógenos, toxinas e inflamación y contribuye a la salud metabólica regulando los procesos de obtención de energía, en especial el metabolismo de la glucosa y la insulina, las cuales se llevan principalmente a cabo por las proteínas y péptidos, incluyendo las inmunoglobulinas, las enzimas, los inhibidores enzimáticos, los factores de crecimiento, las hormonas y los agentes antibacteriales. Uno de los constituyentes de mayor importancia comercial en la leche son los lípidos, ya que la leche se valora por su contenido de grasa, pero al mismo tiempo, las proteínas juegan un papel importante, ya que tienen propiedades tecnológicas únicas, que influyen en las propiedades de la leche (pH, temperatura) y la mayoría de los productos lácteos (Thompson *et al.*, 2009).

La fracción proteica de la leche está conformada en un 80% por fosfoproteínas ácidas ricas en prolina, denominadas caseínas totales, también llamada fracción insoluble, éstas se encargan de retener la grasa en la leche formando una emulsión; mientras que la otra porción (20%) está representada por proteínas no fosforiladas llamadas proteínas del suero o fracción soluble

(Thompson *et al.*, 2009; OEA/GTZ, 2003; Formaggioni *et al.*, 1999). Las proteínas del suero son termosensibles y se desnaturalizan por el calor a temperaturas superiores a los tratamientos de pasteurización, dicha inestabilidad se debe en parte a la ausencia de fósforo, bajo contenido en prolina y alto contenido en cisteína y metionina (González de Llano, 1990).

De acuerdo a su movilidad electroforética las caseínas se pueden dividir en  $\alpha$ -s1 caseína ( $\alpha$ s1-Cn),  $\alpha$ -s2 caseína ( $\alpha$ s2-Cn),  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -Cn) y  $\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -CN), mientras que las proteínas del suero incluyen la  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La), la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) y la lactoferrina (Thompson *et al.*, 2009; Formaggioni *et al.*, 1999; Ron *et al.*, 1994). Las caseínas calcio sensitivas  $\alpha$ s1-Cn,  $\alpha$ s2-Cn y  $\beta$ -Cn están agregadas en una larga estructura micelar en suspensión coloidal con calcio (figura 1), manteniendo esa estructura por interacción con la  $\kappa$ -CN, la cual estabiliza dicha estructura (Ginger y Grigor; 1999; Vaiman, 1999). La micela tiene forma de pequeñas esferas de 30 a 300 nm de diámetro, estabilizada por puentes de hidrógeno y enlaces iónicos (Walstra *et al.*, 1999). La  $\kappa$ -CN representa entre el 12 y 15% de las caseínas lácteas en bovinos (Fox y Brodkorb, 2008; Grasselli *et al.*, 1997). La precipitación de las caseínas tiene lugar a pH de 4.6 a una temperatura de 20°C, seguido de una ruptura química provocada por la quimosina o la pepsina en la porción hidrofílica de la  $\kappa$ -CN (Plowman y Creamer, 1995; Swaisgood, 1993).

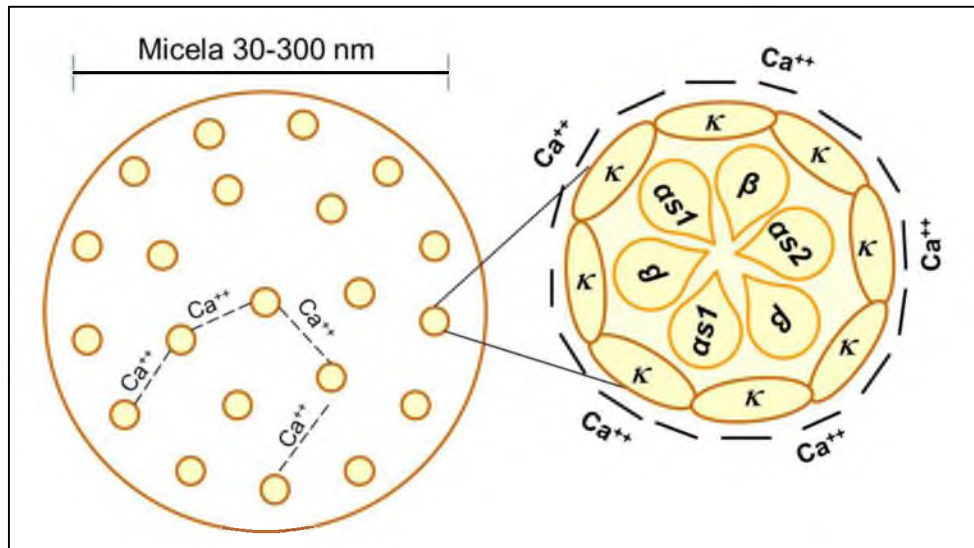


Figura 1. Formación y organización de micelas estabilizadas por  $\text{Ca}^{++}$  y caseínas ( $\alpha\text{s}1$ ,  $\alpha\text{s}2$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ) en leche.

#### 4.6. Factores que afectan la composición y la producción de la leche

La producción de la leche de vaca puede tener diversas variaciones, debido a la influencia de factores ligados al animal, como factores genéticos, fisiológicos, sanitarios y ambientales como la alimentación, el ordeño, el clima y la época de parto (Casado y García, 1985).

**4.6.1. Factores genéticos.** La raza que produce leche con el mayor contenido de grasa es la Jersey, en cuanto a la proporción de proteína total y tipo de proteína producida en la leche, las razas Jersey y Guernsey presentan los mayores porcentajes de proteína total, caseína y suero en comparación con vacas Holstein Friesian (tabla 2). A través de selección genética se incrementa

el porcentaje de proteína en la leche, pero la selección individual de algún componente tiene consecuencias negativas sobre la producción de leche, por lo que se selecciona conjuntamente por proteína, grasa y producción de leche (Requena y Agüera, 2007; Morales, 1999; De Peters y Ferguson, 1992).

Tabla 2. Porcentaje promedio de proteína en leche de diversas razas de ganado bovino.

Raza	Proteína Cruda (%)	Proteína	
		Verdadera (%)	Caseína (%)
Jersey	4.22 ± 0.51	4.07 ± 0.49	3.39 ± 0.40
Guernsey	3.70 ± 0.55	3.56 ± 0.53	2.88 ± 0.44
Ayrshire	3.47 ± 0.50	3.30 ± 0.52	2.73 ± 0.43
Holstein	3.22 ± 0.45	3.07 ± 0.43	2.53 ± 0.40

Fuente: De Peters y Ferguson (1992).

El comportamiento químico de la leche, principalmente en la fabricación de queso está influenciado por las características genéticas de las vacas (Benavides, 2003). La detección del polimorfismo genético de las proteínas lácteas, principalmente la  $\kappa$ -CN, ofrece nuevas explicaciones del comportamiento químico de la leche, puesto que las variantes genéticas tienen efectos directos sobre la composición y las propiedades tecnológicas de la leche (Caroli *et al.*, 2009; Puhan y Jakob, 1993).

**4.6.2. Factores fisiológicos.** Durante la lactación la concentración de materia grasa y proteína evolucionan en sentido inverso a la lactosa (Casado y García, 1985). Las concentraciones de grasa y proteína son máximas al inicio de la lactación y mínimas durante el segundo y tercer mes de lactancia, para luego aumentar hasta el final de ésta. Por otra parte la curva de la lactosa sigue la misma tendencia que la curva de producción de leche, la cual aumenta en forma paulatina hasta el segundo mes de lactancia, luego se mantiene constante y disminuye progresivamente hasta el final de la lactación (Latrille, 1993; Lawrence, 1991; Alais, 1985; Casado y García, 1985).

La producción de leche aumenta con la edad del animal, sin embargo el contenido de proteína disminuye. El efecto del número de partos es mayor sobre la producción de leche que sobre su composición, así mismo, el máximo volumen de producción se alcanza entre el tercer y quinto parto (Casado y García, 1985). El contenido de caseína en la leche disminuye con el número de partos, aunque el contenido total de proteína cruda puede no cambiar debido al aumento de las proteínas del suero. Por lo general, se considera que el contenido de proteína total y de caseína es más alto, para una vaca en su primera lactación (De Peters y Ferguson, 1992), mientras que la gestación afecta la composición de la leche en forma indirecta por acelerar el fin de la lactación (Covington, 1993; Casado y García, 1985).

**4.6.3. Alimentación.** Una alimentación apropiada en el ganado es esencial para obtener una máxima producción de leche, las típicas dietas formuladas para ganado de alta producción lechera contienen elevadas concentraciones de carbohidratos fácilmente fermentables, más que de grasas y a menudo dichas dietas provocan una condición denominada síndrome de baja materia grasa de la leche. Este síndrome deriva de una alteración en el proceso fermentativo a nivel ruminal con un cambio en el pH del rumen, como consecuencia una depresión en la digestión de la fibra y por ende un cambio en los productos de fermentación ruminal, disminuyendo el sustrato disponible para la síntesis de grasa a nivel de la glándula mamaria (Requena y Agüera, 2007; Morales, 1999).

La concentración de la proteína cruda en la dieta afecta la producción de leche y consecuentemente el porcentaje de proteína láctea, sin afectar el porcentaje de materia grasa, salvo que se afecte el crecimiento microbiano y la actividad celulolítica, que es la que contribuye con el sustrato para la síntesis de materia grasa en la glándula mamaria (Requena y Agüera, 2007; Morales, 1999; Latrille, 1993; Casado y García, 1985).

**4.6.4. Velocidad de Ordeño.** Las variaciones en el procedimiento de ordeña y/o frecuencia de ordeña prácticamente no tienen efecto sobre el contenido de proteína, a diferencia del efecto observado para la grasa, donde una ordeña completa incrementa el contenido graso de la leche en comparación

a una ordeña incompleta. Al acortar el lapso de ordeña se afecta negativamente el porcentaje de grasa de la leche obtenida en esa ordeña. La inflamación de la glándula mamaria, causado por un mal manejo, provoca un cambio en la composición de la grasa: se observa un aumento de los ácidos grasos de cadena corta y ácidos grasos libres, y una disminución de los ácidos grasos de cadena larga y fosfolípidos. El efecto sobre el porcentaje de proteína total es pequeño, sin embargo, la mastitis altera drásticamente la composición de la proteína, disminuyendo las fracciones de caseína y aumentando las proteínas séricas (Morales, 1999; Kruze, 1998; Alais, 1985).

**4.6.5. Estación del año.** Existe un efecto de la estación del año sobre el porcentaje de grasa de la leche, donde los meses de verano se caracterizan por promediar 0.4% menos de grasa que los meses de invierno. También se observa una modificación en la composición de la grasa, en verano disminuye el ácido palmítico en relación al esteárico y los ácidos octadecanoicos. Se ha observado que tanto el porcentaje como la producción de proteína son mayores durante el otoño e invierno que lo obtenido en primavera y verano. Sin embargo, el estado de la lactancia y las prácticas de alimentación confunden esas observaciones, las vacas en primavera y a pastoreo producen leche con mayor porcentaje de proteína (Morales, 1999; Covington, 1993; Lawrence, 1991; Alais, 1985; Casado y García, 1985).

#### 4.7. Composición del queso (características fisicoquímicas)

Los componentes de la leche intervienen en las propiedades tecnológicas de ésta y la fracción proteica juega un papel importante por su diversidad, complejidad, concentración y proporción. El contenido y las propiedades de las caseínas determinan la producción de queso, porque forman la consistencia del queso (Molina *et al.*, 2003; Braunschweig *et al.*, 2000; Plowman y Creamer, 1995; Swaisgood, 1993). La formación del queso es principalmente gobernada por la  $\beta$ -Cn y la  $\kappa$ -CN, mientras las otras dos caseínas determinan la habilidad de las micelas para transportar  $\text{CaPO}_4$  coloidal (Vaiman, 1999). Un incremento en la proporción de las caseínas como  $\alpha$ s1-Cn,  $\beta$ -Cn y  $\kappa$ -CN aumenta la producción de queso (Bobe *et al.*, 1999). Dentro de las caseínas, la  $\kappa$ -CN tiene un importante papel en el rendimiento quesero debido a su participación en la estabilización de la formación de micelas previniendo la precipitación de las caseínas de la leche, ya que la  $\kappa$ -CN contiene en su extremo C-terminal oligosacáridos (gal y glu) que aumentan la hidrofiliidad de la proteína favoreciendo la formación de micelas.

Todas las caseínas presentan un polimorfismo genético que consiste en la sustitución de uno o dos aminoácidos y rara vez la supresión de un segmento. En bovinos de razas lecheras europeas (*Bos taurus*) se han descrito 6 variantes alélicas A, B, C, E, F y G del gen  $\text{CAS}\kappa$  (Requena y Agüera, 2007; Barroso *et al.*, 1998; Horne y Muir, 1994). En la tabla 3 y en la figura 2 se

muestran las variantes alélicas del gen  $CAS\kappa$  y la sustitución aminoacídica de dichas variantes.

Tabla 3. Variantes alélicas del gen  $CAS\kappa$

Variante	Sustitución aminoacídica
F	R <sup>31</sup> -H <sup>31</sup>
G	R <sup>118</sup> -C <sup>118</sup>
G y H	T <sup>156</sup> -I <sup>156</sup>
B y B2	T <sup>157</sup> -I <sup>157</sup>
B y B2	D <sup>169</sup> -A <sup>169</sup>
B2	I <sup>174</sup> -T <sup>174</sup>
E	S <sup>176</sup> -G <sup>176</sup>

10	20	30	40	50	60	70
MMKSFFLVVTILALTLPLFLGAQEONQEOP	<b>I</b> RCEKDERFFSDKI	AKYIPIQYVLSRYPSYGLNYYQQKPVA				
80	90	100	110	120	130	140
LINNQFLPYPYAKPAAVRSPAQILQWQVLSNTVPAKSCQAQPTTMA	<b>R</b> HHPHLSFMAI	PPKKNQDKTEI				
150	160	170	180	190		
PTINTIASGEPTSTP	<b>T</b> I EAVESTVATLE	<b>A</b> SPEV	<b>I</b> <b>E</b> <b>S</b> PEINTVQVTSTAV			

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la  $\kappa$ -CN en bovinos. Se muestra en negritas las sustituciones de las variantes.

Las variantes de  $CAS_{\kappa}$  también influyen en la interacción entre las micelas de caseína. La variante B de  $CAS_{\kappa}$  se caracteriza por tener menor número de cargas negativas, que se asocia a menor tiempo de coagulación y a un incremento en la firmeza de la cuajada, en relación con la variante A de  $CAS_{\kappa}$  (Schaar, 1984). Se considera que la firmeza del coágulo está relacionado con el tamaño de la micela, lo que explicaría que la leche de vacas con la variante B de  $CAS_{\kappa}$  contienen un 40% más micelas pequeñas, comparado con la leche de la variante A, lo que significa un aumento en la densidad del coágulo por generar mayor retención de sólidos en la cuajada y por ende un mayor rendimiento quesero (Jakob y Puhan, 1995).

#### **4.8. Herramientas moleculares en la genotipificación**

Existe una abundante gama de técnicas moleculares modernas y marcadores genéticos usados para evaluar directa o indirectamente variaciones en la información genética de individuos y poblaciones, tales como: polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD), número variable de repeticiones en tándem (VNTR) o minisatélites, simple repeticiones en tándem (STR) o microsatélites y polimorfismo de nucleótido simple (SNP) (Bedoya *et al.*, 2002).

**4.8.1. Marcadores moleculares.** Desde la PCR se han desarrollado una serie de técnicas utilizadas para los estudios de variabilidad genética en las especies animales. Entre esas técnicas se cita el uso de los marcadores

genéticos, la cual se basa en la clonación y secuenciación de fragmentos de ADN (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

Solís y Andrade (2005) definen que un marcador es un carácter o un gen que debido al ligamiento puede usarse para indicar la presencia de otro gen; es decir, cualquier característica A que esté asociada a la presencia o expresión de una característica B se considera como un marcador. La importancia de los marcadores radica en que ofrecen la posibilidad de estudiar poblaciones de organismos y seleccionar a aquellos que presenten rasgos de interés para el hombre.

**4.8.1.1. Microsatélites.** Son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pb o nucleótidos (di, tri, tetra y sexta nucleótidos), que se repiten en tándem y el número de repeticiones que presentan es relativamente pequeño (10 a 50 veces) por lo que se identifican fácilmente mediante PCR (Goldstein y Schlötterre, 1999; Fries *et al.*, 1990; Tautz, 1989; Weber y May, 1989). Se encuentran distribuidos al azar con frecuencia en el ADN genómico en la heterocromatina próxima al centrómero del cromosoma tanto en el ADN extracromosómico como el ADN mitocondrial. Presentan un elevado grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple, tienen una confiabilidad del 100% y son fáciles de medir y analizar; estas circunstancias hacen que se utilicen como marcadores genéticos y su codominancia permite diferenciar a los individuos homocigotos de los heterocigotos. Sus formas alternativas o alelos

varían en el número de repeticiones existentes en el locus de cada individuo (Lewin, 2001; Goldstein y Schlötterre, 1999).

Los microsatélites se han convertido en los marcadores de elección en la identificación individual y pruebas de paternidad a través de la tipificación sanguínea; en los análisis de ligamiento genético, mapas genéticos y genómica comparativa: un mapa genético con varios marcadores se convierte en una herramienta útil para identificar genes responsables de caracteres de interés; en estudios de la diversidad genética poblacional se han utilizado para estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas; y en la asignación de individuos a poblaciones o razas basándose en probabilidades y en distancias genéticas (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005; Alonso, 1999).

**4.8.1.2. RFLP.** Este tipo de estudio involucra la detección de un segmento específico (marcador molecular) en el ADN de estudio por hibridación con un fragmento de secuencia complementaria al marcador (sonda). En el proceso, el ADN en estudio es digerido por medio de una enzima de restricción. Este tipo de enzimas corta el ADN en una secuencia determinada o sitio de restricción. La variabilidad genética presente en el marcador molecular se observa como diferencias en la secuencia del ADN genómico debidas a duplicaciones, deleciones, inserciones, etc. que modifican la distancia entre

pares de sitios de restricción y generan fragmentos polimórficos de diferentes tamaños (Picca *et al.*, 2004).

Los fragmentos obtenidos por la enzima de restricción se separan por su tamaño mediante electroforesis y se transfieren a una membrana donde son hibridados con la sonda. En el proceso, la sonda hibrida solamente con fragmentos de ADN inmovilizados en la membrana que presenten la secuencia complementaria a la misma. Para visualizar los polimorfismos se expone la membrana a una placa radiográfica. La ventaja de los RFLPs radica en que son altamente reproducibles, codominantes y multialélicos. A su vez cuentan con la desventaja de ser muy laboriosos, difíciles de automatizar, requieren de infraestructura adecuada para mantener las sondas, trabajar con radiactivos, lo que los hace relativamente costosos (Picca *et al.*, 2004).

**4.8.1.3. PCR-RFLP.** Técnica que radica en el corte con endonucleasas de restricción de los productos amplificados por PCR. Si dos amplicones presentan una variación de la secuencia nucleotídica, en los sitios de reconocimientos de las enzimas de restricción, generarán distintos patrones de fragmentos (Lara *et al.*, 2005).

#### **4.9. Estudios genéticos en ganado bovino sobre la calidad de la leche**

Uno de los aspectos buscados en la mejora genética del ganado lechero es incrementar la calidad de la leche, para elaborar productos de mayor calidad

y valor nutritivo. Diversos estudios se han enfocado a la composición de la leche, específicamente al contenido de grasa y proteína. En estudios previos en las razas lecheras europeas (Holstein, Jersey, Ayrshire, Guemeys), altamente seleccionadas para la producción de leche, se ha observado que existe un efecto significativo de los genes que codifican para las caseínas contenidas en la leche, mismas que estimulan la lactancia, sobre caracteres de producción lechera (Fries y Ruvinsky, 1999).

Las variantes presentes en la leche están determinadas por la genética mendeliana. La presencia de determinadas variantes genéticas en la leche tiene un efecto importante sobre las propiedades queseras de la leche. Las caseínas están codificadas por un grupo de genes autosómicos que se encuentran ubicados en una región de 250 kb en la posición 6q31-33 (Requena y Agüera, 2007; Corral *et al.*, 2006; López y Vazquez, 2004; Fox *et al.*, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2000; Formaggioni *et al.*, 1999; Freyer *et al.*, 1999; Threadgill y Womack, 1990).

Se han empleado programas de reproducción en bovinos Frisón, donde la selección genética es apoyada en las pruebas de progenie, mejorando significativamente la producción y composición de la leche, así mismo se han llevado a cabo estudios con marcadores moleculares para identificar genes que aumentan la calidad de la leche utilizando métodos avanzados de electroforesis, la tecnología del ADN, la PCR y los marcadores moleculares

(Requena y Agüera, 2007; Díaz *et al.*, 2006). Sin embargo, estas asociaciones son poco estudiadas en bovinos de doble propósito.

En la actualidad se ha convertido en una necesidad el mejoramiento asistido por marcadores moleculares, por la efectividad y la alta correlación con caracteres cualitativos y cuantitativos (Dentine, 1999). Blake (2008), sugirió que las nuevas tecnologías moleculares de selección genética y genómica ofrecen un mayor potencial en ganancia genética que los esquemas nucleares, ovulación múltiple y transferencia de embriones. Si bien las técnicas en reproducción animal tales como inseminación artificial, y transferencia de embriones han contribuido enormemente en la producción ganadera, también ha afectado de forma contundente su variabilidad genética (Pimentel de Mello *et al.*, 2003).

#### **4.9.1. Estudios del gen $CAS\kappa$ en bovinos**

En bovinos se han realizado estudios solo sobre dos variantes alélicas (A y B) del gen  $CAS\kappa$  que codifica para la  $\kappa$ -CN, ya que son de mayor importancia en comparación con las otras variantes. La leche derivada de animales con el gen  $CAS\kappa$  AA tiene menor porcentaje de  $\kappa$ -CN y una mayor proporción de micelas grandes. Mientras que la leche de animales  $CAS\kappa$  BB presenta mayor proporción de  $\kappa$ -CN, y a su vez micelas más pequeñas, mayor contenido proteico, mayor estabilidad al calor y a la congelación, menor tiempo de coagulación, cuajo más consistente y sobre todo un aumento de 5 a 10% del rendimiento quesero (Requena y Agüera, 2007).

Por otro lado el genotipo homocigoto de  $CAS_{\kappa}$  BB ha mostrado ser superior en el porcentaje de grasa y proteína, mientras que el genotipo heterocigoto  $CAS_{\kappa}$  AB es mejor para características de producción de leche sugiriendo un efecto de heterosis. Además recientes reportes indican que las vacas con el genotipo  $CAS_{\kappa}$  BB tienen un 20% más  $\kappa$ -CN que vacas con el genotipo  $CAS_{\kappa}$  AA, es por ello que se ha elegido al genotipo B como un criterio de selección para mejorar la producción de leche (Heck *et al.*, 2009).

Belitz y Grosch (1997) indican que la proporción de  $\kappa$ -CN es inversamente proporcional al tamaño de las micelas, además la  $\kappa$ -CN es el sustrato específico de la quimosina (cuajo) durante la primera fase de coagulación. Por lo que respecta a las diferencias nucleotídicas de la variante A con respecto a la B, estos se diferencian en las posiciones aminoacídicas 136 y 148 (ubicado en el tercer exón). La variante A contiene el triplete ACC que codifica para T<sup>136</sup> y el triplete GAT que codifica para D<sup>148</sup>, en cambio la variante B posee para las mismas posiciones los tripletes ATC y GCT que codifican para I<sup>136</sup> y A<sup>148</sup> (Farrell *et al.*, 2004; Barroso *et al.*, 1998). En bovinos se ha amplificado el marcador MB002 para la identificación de las variantes A y B del gen  $CAS_{\kappa}$  que codifica para la  $\kappa$ -CN. En diversos estudios reportan a este marcador como JK5 y JK3 (Rojas *et al.*, 2009; Veli *et al.*, 2004; Terán y Santillán, 2006; López y Vázquez, 2004).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Localización geográfica

El presente trabajo se realizó en la región del Papaloapan del estado de Oaxaca. La región del Papaloapan tiene un clima cálido semihúmedo y húmedo, con una precipitación anual promedio de 1,300 a 3,000 mm. Esta región se encuentra al Noroeste de la Sierra de Oaxaca o Sierra Norte, con una latitud norte de 18° 05', una longitud oeste de 96° 08', a una altitud de 20 m.s.n.m. (OEIDRUS-OAXACA, 2005).

### 5.2. Toma de muestras de sangre

Se tomaron muestras de plasma sanguíneo de la vena yugular (3-5 mL/animal) a 200 bovinos de doble propósito (cruza de *Bos taurus* con *Bos indicus*) y se depositaron en tubos conteniendo EDTA (10.8 mg) como anticoagulante, una vez obtenido el plasma se transportó y se almacenó a -20°C en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, hasta su procesamiento.

### 5.3. Extracción de ADN

Se utilizó el **Kit de Extracción de ADN Sanguíneo GF-1 (Vivantis®)**, usando la metodología como lo indica el proveedor (Ver anexo 1).

#### 5.4. Amplificación del ADN

A partir de ADN genómico se amplificó por medio de la PCR el marcador MB002. La mezcla de reacción para amplificar el marcador MB002 de *CASκ* se usó como se indica en la tabla 4.

Tabla 4. Reacción de amplificación de ADN

Reactivo	Volumen/concentración
Accu Prime Taq DNA polymerase System*	0.2 $\mu$ L
10X Accu Prime PCR Buffer II	1 $\mu$ L
Oligonucleótidos (50 pM)	0.1 $\mu$ L
ADN	100 ng
Volumen final	10 $\mu$ L

\*contiene 2 mM de dNTP's, se utiliza un kit comercial para la amplificación de este tipo de fragmentos en donde no está especificada la concentración de la enzima Taq polimerasa.

Las amplificación se realizó en el termociclador MAXYGENE (AXYGEN Scientific®) utilizando los oligonucleótidos enlistados en la tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para amplificar ADN de bovinos de doble propósito

Nombre	Secuencia	T <sub>m</sub> (°C)	Longitud (pb)
MB002 F	ATCATTATGGCCATTCCACCAAAG	54	25
MB002 R	GCCATTTTCGCTTCTCTGTAAACAGA	60	26

F: secuencia inicial 5'      R: secuencia terminal 3'

El tiempo de extensión se calculó tomando en cuenta que por cada 1000 pb se requiere de 1 min de extensión (tabla 6).

Tabla 6. Programa de amplificación de los fragmentos de ADN bovino.

No. de ciclos	Etapa	Tiempo (min)	Temperatura
			(°C)
1	Desnaturalización	5	94
	Desnaturalización	1	94
30	Alineamiento	30 seg	56.1
	Extensión <sup>a</sup>	30 seg	72
1	Extensión	10	72

a. Por cada 1000 pb el tiempo de extensión es de 1 min.

### 5.5. Electroforesis de ADN

Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2% dependiendo del tamaño del fragmento a separar (Voytas, 2000). Las muestras se cargaron con una solución amortiguadora de carga SBX 6X (40% sacarosa, 0.25% bromofenol y 0.25% xilencianol). La migración se efectuó a voltaje constante de 100 volts. La solución amortiguadora para esta migración fue TBE (Tris, borato y EDTA) 0.5X. El gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un sistema de fotodocumentación (INGENIUS SYNGENNE®).

### 5.6. Genotipificación

Las pruebas de PCR-RFLP se realizaron utilizando el marcador molecular MB002 amplificado y la enzima de restricción *Hinf I* (Fermentas®) para el diagnóstico de los alelos A y B del gen *CASκ* (figura 3). El producto de PCR (10 µL) se digirió con 10 U (1 µL) de la enzima *Hinf I* y 2 µL 10X Buffer R, aforándose a 30 µL con agua estéril y se incubó por 2 horas a 37 °C.

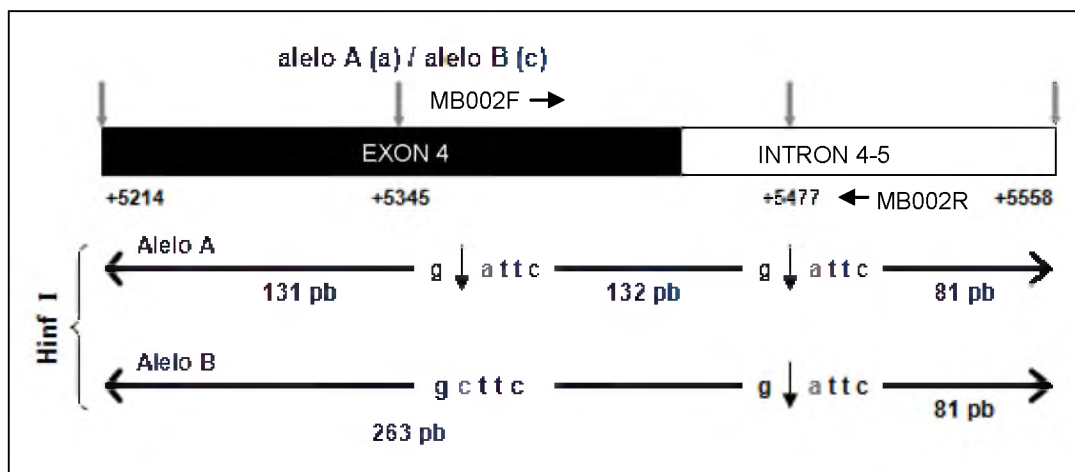


Figura 3. Patrón de restricción del marcador MB002 utilizando *Hinf I* (adaptado de López y Vásquez, 2004).

Los fragmentos digeridos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 3%. Las bandas se visualizaron en un sistema de fotodocumentación (INGENIUS SYNGENNE®).

### 5.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la variabilidad genética se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas, y el equilibrio de Hardy Weinberg con la prueba de  $\chi^2$  (Ji cuadrada).

## 6. RESULTADOS

El producto de PCR del marcador MB002 se amplificó a partir de ADN genómico con los oligonucleótidos MB002F y MB002R, obteniéndose un producto de 344 pb. El producto se digirió con la enzima *Hinf I* (figura 4), observándose los patrones de restricción 131/132 y 81 pb en los individuos que presentan el genotipo AA (carriles 4, 8 y 9), dos fragmentos de 263 y 81 pb en los individuos BB (carril 10) y tres fragmentos 263, 131/132 y 81 pb aproximadamente en los individuos AB (carriles 2, 3, 5, 6 y 7).

De las 200 muestras analizadas solo 108 amplificaron para el marcador MB002, es posible que las 92 muestras restantes contengan alguna otra variante alélica (C, E, F o G).

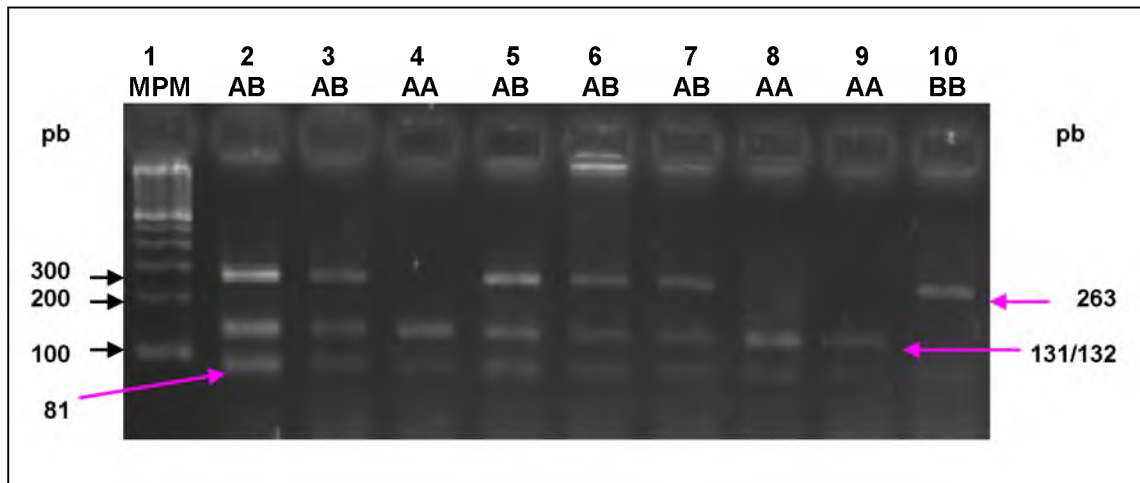


Figura 4. Genotipificación del gen  $CAS\kappa$  en bovinos de doble propósito con electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

En la tabla 7 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas y esperadas de la población de bovinos de doble propósito. Las frecuencias genotípicas obtenidas correspondieron a 0.34 para el homocigoto AA; 0.65 para el heterocigoto AB y 0.01 para los homocigotos BB y frecuencias alélicas de 0.67 para el alelo A y 0.34 para el alelo B. Asimismo, se observa la heterocigosidad media de 0.6481 de los mismos. La población en estudio no se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg con un valor de  $\chi^2 = 21.93$  con dos grados de libertad (P=0.999).

Como se puede apreciar, en este estudio, el alelo A del gen  $CAS\kappa$  fue más predominante, presentando una frecuencia de 0.67 mientras que la del alelo B correspondió a tan sólo 0.34.

Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas en bovinos de doble propósito

Genotipo	Observado		Esperado ( $p^2$ $2pq$ $q^2$ )		Alelos	Frecuencias Alélicas
	Número de individuos	Frecuencias genotípicas	Número de individuos	Frecuencias genotípicas		
AA	37	0.34	48.00	0.44	A	0.66
AB	70	0.65	49.33	0.45	B	0.34
BB	1	0.01	12.68	0.11		
Heterocigosidad		0.6481				

En el gen  $CAS\kappa$ , estudiado en los bovinos, se han descrito 6 variantes alélicas A, B, C, E, F y G. La variante B presenta un contenido proteico más alto, mayor estabilidad al calor y a la congelación, menor tiempo de coagulación cuajo más consistente y un rendimiento quesero de 5 a 10% (Requena y Agüera, 2007; Barroso *et al.*, 1998; Horne y Muir, 1994), es por tal razón que en este estudio sólo se analizó la variante alélica B y su asociación con la variante alélica A, dando como resultado 37 homocigotos dominantes (AA), 70 heterocigotos (AB) y 1 homocigoto recesivo (BB), dando un total de 108 animales con 2 de las 6 variantes alélicas descritas de los 200 animales muestreados. Es posible que los 92 animales restantes, tengan alguna otra variante alélica diferente a las estudiadas en el presente trabajo (figura 5).

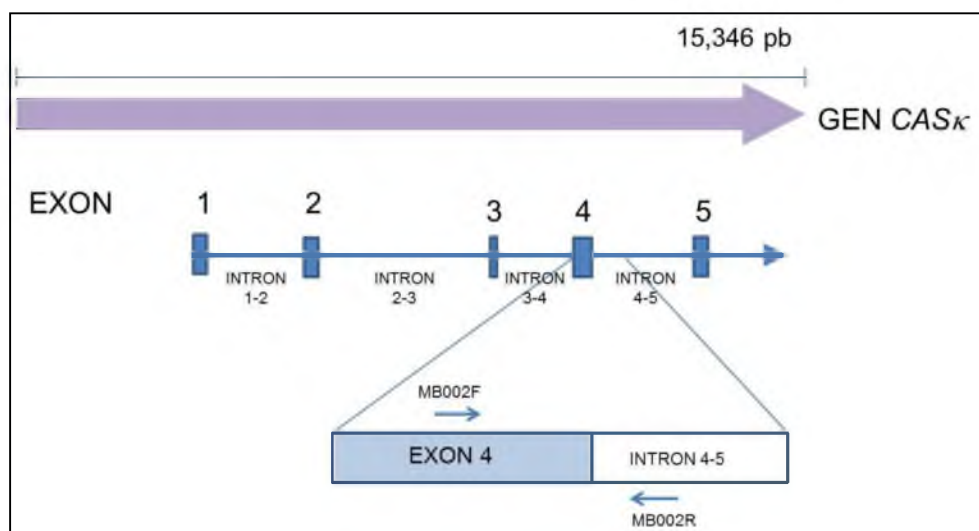


Figura 5. Regiones exónicas e intrónicas del gen  $CAS\kappa$ .

En la tabla 8 se comparan las frecuencias alélicas de  $CAS\kappa$  de ambos alelos (A y B) de algunas razas de bovinos, donde las frecuencias alélicas del

CAS $\kappa$  B, son superadas en la raza Jersey, en la raza Pardo Suizo Americano y en la raza Normanda con 0.77, 0.57 y 0.56, respectivamente, contra 0.34 en bovinos de doble propósito, pero esto, superior a lo encontrado en razas de bovinos Cebú, Holstein y Gyr con 0.26, 0.10 y 0.07, respectivamente.

Tabla 8. Frecuencias alélicas de CAS $\kappa$  de algunas razas de bovinos productores de leche.

Raza	Frecuencia alélica		Referencia
	CAS $\kappa$ A	CAS $\kappa$ B	
<i>Bos taurus x Bos indicus</i>			
Doble Propósito	0.67	0.34	Este estudio
<i>Bos taurus</i>			
Jersey	0.23	0.77	Grosclaude, 1998; Van Eenennaam y Medrano, 1991; McLean <i>et al.</i> , 1984
Pardo Suizo Americano	0.43	0.57	Cervantes <i>et al.</i> , 2007
Normanda	0.44	0.56	Grosclaude, 1998; Van Eenennaam y Medrano, 1991; McLean <i>et al.</i> , 1984
Guernsey	0.73	0.27	Van Eenennaam y Medrano, 1991; Voelker <i>et al.</i> , 1997
Shorton Lechero	0.89	0.11	Van Eenennaam y Medrano, 1991
Holstein	0.90	0.10	Viana <i>et al.</i> , 2001
<i>Bos indicus</i>			
Cebú	0.74	0.26	Cervantes <i>et al.</i> , 2007
Gyr	0.93	0.07	Kemenes <i>et al.</i> , 1999
Guzerá	0.92	0.08	Kemenes <i>et al.</i> , 1999
Nelore	0.91	0.09	Kemenes <i>et al.</i> , 1999

## 7. DISCUSIÓN

Las variantes alélicas del gen  $CAS\kappa$  están asociadas al porcentaje de proteína total de la leche y su contenido (López, 1998), e influyen significativamente sobre el tiempo de coagulación del cuajo, la firmeza y rendimiento quesero, mostrando valores superiores en la leche de vacas con el genotipo BB en relación con las de genotipo AA (Requena y Agüera, 2007; Schlieben *et al.* 1991; Van Eenennaam y Medrano, 1991). La mayor frecuencia del alelo A ha sido una característica común en la mayoría de las poblaciones de ganado productor de leche que se ha estudiado (Osta, 1994; Zardowny y Kühnlein 1990), específicamente en la raza Holstein, donde el alelo A es más frecuente (Viana *et al.* 2001; Bonvillani *et al.* 2000), sin embargo, Escoda *et al.* (1981) describieron frecuencias elevadas de la variante A en ganado Cebú ( $n=0,90$ ), mientras que Cervantes *et al.* (2007) encontraron 0.74 en el mismo tipo de ganado (cebú).

En distintos estudios de caracterización de razas bovinas se ha observado que el alelo B presenta mayores frecuencias en razas *Bos taurus* que en *Bos indicus* (Golijow *et al.* 1999; Kememes *et al.* 1999; Tambasco, 1998; Del Lama y Zago, 1996; Backer y Manwell, 1980). Así mismo, el ganado de doble propósito se originó de la mezcla de ambos, *Bos taurus* (Pardo suizo americano, Holstein, Simmental y Jersey) y *Bos indicus* (Brahman, Gyr), en este estudio predominó el alelo A sobre el alelo B (0.67 y 0.34, respectivamente) y aunque solo un individuo presentó el genotipo  $CAS\kappa$  BB,

también los animales que resultaron heterocigotos (AB) poseen la variante alélica dado estos resultados, es posible que la calidad de la leche tenga un mayor contenido de sólidos totales, incluyendo proteína, en comparación con los individuos que presentaron la variante alélica A.

Van Eenennaam y Medrano (1991) demostraron que la variante alélica B tiene un mayor nivel de expresión con respecto a la variante alélica A en la glándula mamaria y por lo tanto, la proporción de  $\kappa$ -CN en la leche depende del genotipo del animal, en el siguiente orden  $BB > AB > AA$ , llegando a tener una diferencia proteica del 3% entre los animales con la variante alélica B contra los animales con variante alélica A.

Existen estudios sobre la variabilidad genética del gen  $CAS\kappa$  en diferentes razas de bovinos lecheros (Viana *et al.* 2001; Kemenes *et al.* 1999; Grosclaude, 1998; Van Eenennaam y Medrano, 1991; McLean *et al.* 1984) donde las razas lecheras especializadas son las más estudiadas, sin embargo no todas se caracterizan por su calidad. La raza Holstein, se representa por sus altos volúmenes de producción de leche, pero, es catalogada de baja calidad debido a su menor concentración de sólidos totales, grasa y proteína (Benavides, 2003), mientras que la raza Jersey se caracteriza por volúmenes de leche inferiores a los de la raza Holstein pero la calidad de su leche es muy superior a ésta y a varias razas lecheras (Grosclaude, 1998; Van Eenennaam y Medrano, 1991; McLean *et al.*, 1984), sin embargo, la explotación de la raza

Jersey está limitada a ciertas condiciones climáticas. Todo esto ha generado expectativa sobre mejores alternativas en cuanto a la producción de leche con calidad en otras razas de ganado (Munizaga *et al.* 2004), saliendo a flote el ganado de doble propósito ampliamente utilizado en las regiones tropicales, con altas temperaturas y humedad, como ganado productor de leche y carne, dando buenos resultados en su explotación.

La heterocigosidad que presenta la población en estudio (0.6481), indica que la población es muy heterogénea, debido a la mezcla de razas con la cual se origino este tipo de ganado, una mezcla de las cruza suizo-cebú, Holstein-cebú y ganado criollo-cebú (Cervantes *et al.*, 2007)

El ganado de doble propósito resulta atractivo para la calidad de su leche, las frecuencias alélicas de  $CAS\kappa B$  (0.34) fueron superiores debido a las condiciones en las cuales se maneja y explota este tipo de ganado, con respecto a otras razas como Cebú, Holstein y Gyr (0.26, 0.10 y 0.07, respectivamente; Cervantes *et al.* 2007, Viana *et al.* 2001; Kemenes *et al.* 1999), mostrando ser una buena alternativa de explotación como ganado lechero, en el trópico mexicano, por su calidad en leche.

Mediante la técnica PCR-RFLP, herramienta sencilla y de bajo costo, se pueden identificar aquellos animales portadores de la variante alélica B y con ello realizar programas de mejoramiento genético, mediante cruza dirigidas, con la finalidad de obtener animales con mejor calidad de leche, contribuyendo al desarrollo económico de la región.

## 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se determinaron las variantes genéticas A y B del gen  $CAS\kappa$  de 108 animales de los 200 muestreados, es posible que los 92 animales restantes contengan alguna otra variante alélica diferente a las estudiadas en el presente trabajo.
- Se observó que el alelo A predominó sobre el alelo B, 0.67 sobre 0.34.
- Se determinó que los bovinos presentaron principalmente el genotipo  $CAS\kappa$  AA, AB y BB.
- La población no se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg.
- La alta frecuencia de heterocigotos (AB) en contraste con la casi nula frecuencia de homocigotos BB, se debe a las cruzas indiscriminadas y a la poca orientación hacia un objetivo de producción.
- A partir de estos datos se harán las pruebas correspondientes de correlación de genotipo e indicadores fenotípicos, con la finalidad de seleccionar a aquellos individuos que dieron positivo al alelo B, realizar cruzas dirigidas para mejorar y perpetuar la estirpe con la finalidad de aumentar la calidad de la leche y con ellos la producción de queso.

## 9. LITERATURA CITADA

- Alais, Ch. 1985. Ciencia de la leche. Principios de Técnica Lechera. Reverté S. A. Barcelona, España. 3-11 pp.
- Alexander, L. J., A. F. Stewart, A. G. Mackinlay, T. V. Kapelinskaya, T. M. Tkacit and S. I. Gorodetsky. 1988. Isolation and characterization of the bovine k-casein gene. *Eur. J. Biochem.* 178: 395-401.
- Alonso, A.A. 1999. Regiones microsatélites del genoma humano (short tandem repeats). Aplicaciones en Genética Forense. La Prueba del ADN en medicina forense, la genética al servicio de la ley en el análisis de indicios criminales y en la investigación biológica de la paternidad. Edit. Masson, S. A. Barcelona, España.
- Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA). 1995. El ganado Vacuno en México. *Claridades Agropecuarias*. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Revista de Publicación Mensual. México. 23:3-5.
- Aranguren-Méndez, J. A., R. Román-Bravo, W. Isea, Y. Villasmil y J. Jordana. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 13(1): 30-42.
- Báez Ruiz U. A. 2000. Control y Prevención de Enfermedades en Ganado Bovino de Doble Propósito En Tabasco. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). México.
- Barroso, A; Dunner, S; Cañón, J. 1998. Technical note: Detection of Bovine Kappa-casein variants A, B, C, y E by Means of Polymerase Chain Reaction-single strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). *J. Anim. Sci.* 76:1535-1538.
- Bedoya, G; Carvajal. L.G.; Bermúdez, N.R.; Moreno F.L. 2002. Estructura molecular y poblacional del ganado criollo colombiano (GCC). *Rev. Col. Cienc. Pec.* 14: 107-118.

- Belitz, H-D y Grosch, W. 1997. Química de los alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 1087 p.
- Benavides Castro, T.A. 2003. Efecto de las Variantes Genéticas A y B de  $\kappa$ -Caseína y  $\beta$ -lactoglobulina sobre las Propiedades de Coagulación de la Leche. Tesis de Licenciatura. Escuela de Ingeniería en Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Chile. Valdivia Chile.
- Blake R.W. 2008. Perspectivas de la investigación pecuaria en el mundo tropical: Utilización de recursos genéticos de ganado bovino. Disponible en: Duran G. y Campos R. (Eds). Perspectivas de conservación. Mejoramiento y utilización de recursos genéticos criollos y colombianos en los nuevos escenarios del mejoramiento animal. UNAL-Palmira, Colciencias y Fedegan. 1-16 pp.
- Bobe, G., Beitz D. C. Freeman A. E. and Lindberg G. L. 1999. Effect of Milk Protein Genotypes on Milk Protein Composition and Its Genetic Parameter Estimates. J. Dairy Sci. 82(12): 2797-2804.
- Bonvillani, A.G.; Di Renzo, M.A.; Tiranti, I.N. 2000. Genetic polymorphism of milk protein *loci* in Argentinian Holstein cattle. Gen. and Mol. Biol. 23(4): 819-823.
- Braunschweig, M; Hagger, C; Stranzinger, G. and Puhán Z. 2000. Associations between Casein haplotypes and Milk production traits of Swiss Brown cattle. En: J. Dairy Sci. 76:1387-1395.
- Caroli A. M., Chessa S., y Erhardt G. J. 2009. Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. J. Dairy Sci. 92 (11): 5335–5352.
- Casado, P. y García, J. 1985. La calidad de leche y los factores que la influyen. Industrias Lácteas Españolas. No. 81. 298 p.
- Cervantes, P., M. Luna, M. Hernández, F. Pérez-Gil, P. Ponce y O. Uffo. 2007. Polimorfismo genético del *locus* de la kappa-caseína, en vacas de diferentes razas y cruces en el trópico mexicano. Rev. Salud Anim. 29 (2): 78-84.
- Corral, J. M., M. Izquierdo, S. Mateos, J.C. Parejo, J. Salazar, A. Rabasco, M. Martínez-Trancón, M. E. Sansinforiano, F. I. Hernández, J. González-

- Crespo, M.A. Jiménez-Hernández, F. J. Portilla, J.A. Padilla. 2006. Asociación del polimorfismo del gen de la  $\kappa$ -caseína (CSN3) con la producción y composición de la leche en ovino merino. Disponible en: [www.aida-itea.org/jornada38/genetica/qtls\\_y\\_genes\\_candidatos\\_ii/qgc9\\_corral.pdf](http://www.aida-itea.org/jornada38/genetica/qtls_y_genes_candidatos_ii/qgc9_corral.pdf). Consultado en junio de 2007.
- Covington, C. 1993. Genetic and environmental factors affecting milk composition and their relationship to cheese yield. In: Cheese yield and factors affecting its control. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Cork. Ireland. 76-84 pp.
- De Peters, E. y Ferguson, J. 1992. Non protein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *J. Dairy Sci.* 75 (11):3192-3209.
- Dentine M R. 1999. Marker-assisted selection. En: Fries R y Ruvinsky A. (Eds) *The genetics of Cattle*. CAB international. Reimpresión. 2006. 497-510 pp.
- Díaz H A.; Alvarez L A.; Muñoz J. E.; Posso A.; Sanabria H. L. 2006 Genetic variability of milk proteins ( $\kappa$ -Casein,  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\alpha$ -Lactoalbumin) in "Hartón Del Valle" Creole cattle. En Proceedings of the 30th International Conference on Animal Genetics. Porto Seguro, Brasil. ISBN 85-85584-03-3 (CD); 85-85584-02-5 (site [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)).
- Escoda A.B, L.O. Álvarez y S. Yerez. 1981. Estudio de los polimorfismos genéticos de las proteínas de la leche producida en algunas haciendas de la zona de Carora. *Rev. Facultad Agronomía (LUZ)*, 6(2): 714-716.
- Farrell, H. M.; Jiménez-Flores, R.; Bleck, G. T.; Brown, E. M; Butler, J. E.; Creamer, L. K.; Hicks, C. L.; Hollar, C. M.; Ng-Kwai-Hang, K. F. and Swaisgood, H. E. 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk-Sixth Revision En: *J Dairy Sci.* 87:1641-1674.
- Formaggioni P., Summer A., Malacarne M., Mariani P. 1999. Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in *bos genus*. *Univ degli Studi di Parma An della Facoltà di Med Vet*. Disponible en: [www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/inde<sup>x2</sup>.htm](http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/inde<sup>x2</sup>.htm). Consultado en junio de 2007.

- Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M., McSweeney P. L. 2000. Fundamentals of Cheese Science. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. 32-34 pp.
- Fox P. F. y Brodtkorb A. 2008. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. Review. Int. Dairy J. 18: 677-684.
- Freyer G., Liu Z., Erhardt G., Panicke L. 1999. Casein polymorphism and relation between milk production traits. J. A. Breed Gen. 116:87-97.
- Fries, R., A. Eggen y G. Strazinger. 1990. The bovine genome contains polymorphic microsatellites. Genomics. 8: 403-406.
- Fries, R. y A. Ruvinsky. 1999. The Genetics of Cattle. CAB International, UK. 511-534 pp.
- Gallardo N. J. L., Villamar A. L., Pérez F. H., Olivera C. E. 2004. Situación actual de la producción de leche de bovino en México 2004. Coordinación General de Ganadería. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 2-4 pp.
- Ginger, M y Grigor M. 1999 Comparative aspects of milk caseins. *Comp. Bioch. Phys. Part B* 1999. 124:133-145.
- Goff, H. D. y Hill A. R. 1993. Chemistry and Physics. Dairy Science and Technology Handbook. Y. H. Hui, VCH Publishers, Inc. 1-62 pp.
- Goldstein, D.B, C y Schlöterre, 1999. Microsatellites. Oxford University Press
- Golijow, C. D., Giovambattista G., Ripoli M.V., Dulout F.N. Lojo M.M. 1999. Genetic variability and population structure in *loci* related to milk production traits in native Argentine Creole and commercial Argentine Holstein cattle. Braz. J. Genet. 22: 395-398.
- González de Llano, D. 1990. Polimorfismo Genético de las proteínas de la leche de vaca. Alimentación, Equipos y Tecnología. Julio-agosto: 77- 81.
- Grasselli M.; Del Cañizo A.; Fernández H.; Miranda M.; Camperi S. Y Cascone O. 1997. ¿Qué hacer con el suero del queso? Ciencia Hoy. 8(43).
- Grosclaude F. 1998. Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relation avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères dulait. INRA. Prod. Anim. 1(1): 5-17.

- Gutiérrez A, B. Pintado, J. de la Fuente. 2000. Uso del polimorfismo genético de las lactoproteínas para mejorar la calidad de la producción lechera. Boletín Anembe. Disponible en: [www.anembe.com/revista/indice.cgi?folder=mar\\_abr\\_00](http://www.anembe.com/revista/indice.cgi?folder=mar_abr_00). Consultado en junio de 2007.
- Heck J. M. L.; Schennink A.; Van Valenberg H. J. F.; Bovenhuis H.; Visker M. H. P. W.; Van Arendonk J. A. M., and Van Hooijdonk A. C. M. 2009. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 92:1192-1202.
- Horne D.S. y Muir D.D. 1994. Genetic polymorphism of  $\kappa$ -casein and rennet coagulation time. Effects of serum phase components. *Milk wisent shaft*; 49:446-449.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2008. Sistema para la consulta del anuario estadístico de Oaxaca. Ganadería. [www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx). Consultado en mayo de 2010
- Jakob, E. and Puhan, Z. 1995. Implications of genetic polymorphism of milk protein on production and processing of milk. *Bulletin of the International Dairy Federation*. IDF. 304: 2-25.
- Kemenes P.A., L.C.A. Reginato, A.J.M. Rosa, I.V. Parker, G.A. Razook, L.A. Figueredo, N.A. Silva, M.A.L. Etchegaray and L.L. Coutinho. 1999.  $\kappa$ -casein,  $\beta$ -Lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzará, Camcu, Charolais, Canchin and Santa Gertrudis cattle. *Genet. Mol. Biol.* 22: 539-541.
- Kruze, J. 1998. La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 2: 7-16.
- Lara, M.A.C.; Nardon, R.F; Bufarah, G.; Demarchi, J.J.A.A.; Sereno, J.R.; Santos, S.A. y Abreu, U.G.P. 2005. Polimorfismo del gen calpaína en razas vacunas por la técnica PCR-RFLP. *Arch. Zootec.* 54: 305-310.
- Latrille, L. 1993. El valor nutritivo de la leche bovina y factores que alteran su composición. *Producción Animal*. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción Animal. Valdivia. Chile. 27-56 pp.

- Lawrence, R.C. 1991. Cheese yield potential of milk. . In: Factors Affecting the Yield of Cheese. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North. New Zealand. 109-120 pp.
- Lewin, B. 2001. Genes. 7a Ed. Edit. INTERAMERICANA-Mc-GRAWILL.
- López Benavides, M. 1998. Correlación entre la constitución genética kappa-caseína y características de producción en vacas Holstein de primer parto en la sabana Bogotá. Primer Simposio de Investigación en la Universidad de la Salle. Colombia.
- López R.E. y Vásquez N. 2004. Determinación del sexo y genotipificación del gen de la  $\kappa$ -caseína en embriones bovinos. Rev. Col. Cienc. Pec. 17(3): 231-240. Disponible en: [//kogi.udea.edu.co/revista/17/17-3-3.pdf](http://kogi.udea.edu.co/revista/17/17-3-3.pdf). Consultado en junio de 2007.
- McLean, D. M.; Graham, E. R. B.; Ponzoni, R. W. and McKenzie, H. 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. J. Dairy Res. 51:531-546.
- Molina, L. H.; Casanova, M.; González, L. A.; Pinto, M.; Carrasco, E. and Brito, C. 2003. Identification of the genetic variants of  $\kappa$ -casein in milk by isoelectric focusing electrophoresis. Int. J. Dairy Tech. Vol. 56(4):211-214.
- Morales S., María Sol. 1999. Factores que afectan la composición de la leche. Revista de Extensión TecnoVet. Universidad de Chile. Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias. Chile. 5(1). Disponible en: [http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet\\_articulo/0,1409,SCID%253D9670%2526ISID%253D459,00.html](http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9670%2526ISID%253D459,00.html). Consultado en mayo de 2010.
- Munizaga, F. G.; Barrales, V. L. y Valenzuela, A. L. 2004. Desarrollo de un modelo para evaluar la factibilidad productiva y económica de la progenie resultante del cruzamiento de vacas Holstein Friesian con toros de las razas francesas Montbeliarde y Normando. Departamento de Ciencias Animales, pontificia Universidad Católica de Chile.
- OEA/GTZ Publicaciones. 2003. Optimización del rendimiento y Aseguramiento de Inocuidad en la Industria de Quesería. Disponible en: Oficina de ciencia y

- tecnología. Washington D C. USA. [http://www.science.oas.org/OEA\\_GTZ/LIBROS/QUESO/queso.htm](http://www.science.oas.org/OEA_GTZ/LIBROS/QUESO/queso.htm).
- Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (OEIDRUS). Tarjeta distrital de información estadística básica. 2005. Distrito 06 Tuxtepec. Oaxaca, México.
- Ortega, L. y Ward R. 2005. El sistema de Ganadería de Doble Propósito: Un sistema eficiente. Facultad de Agronomía. Universidad de Zulia. Maracaibo-Venezuela. 22-26 pp.
- Osta R. 1994. Caracterización genética de proteínas lácteas y sexaje de embriones en ganado vacuno mediante la aplicación de la biotecnología al análisis del DNA. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.
- Picca A.; Helguera, M.; Salomón, N. y Carrera, A. 2004. Capítulo 4. Marcadores Moleculares. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. 61-68 pp.
- Pimentel De Mello. L; Tambasco-Talhari, D; Pozzi, A; Lehmann, L. and Correia De Almeida, L. 2003. Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. En: Genetic. Mol. Biol. Sao Paulo. 26 (2).
- Plowman, J. E. and Creamer, L. K. 1995. Restrained molecular dynamics study of the interaction between bovine-casein peptide 98-111 and bovine chymosin and porcine pepsin. J. Dairy Res. 62:451-467.
- Puhan, Z. y Jakob, E. 1993. Genetic variants of milk proteins and cheese yield. In: Cheese yield and factors affecting its control. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Cork. Ireland. 111-122 pp.
- Requena, F.D. y E.I. Agüera. 2007. Genética de la caseína de la leche en el bovino Frisón (Milk of casein of genetic in the Frison bovine). REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. VIII (1):1695-7504. Disponible en: [www.veterinaria.org/revistas/redvet /n010107.html](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet /n010107.html). Consultado en junio de 2007.
- Rojas, Inioska; Aranguren-Méndez, José; Portillo, María; Villasmil-Ontiveros, Yenen; Valbuena, Emiro; Rincón, Xomaira; Contreras, Gloria; Yañez, Luis.

2009. Polimorfismo genético de la kappa-caseína en ganado criollo limonero. *Revista científica*. XIX (6): 645-649
- Ron, M.; Yoffe O.; Ezra E.; Medrano J.F. and Weller J.I. 1994. Determination of milk protein genotype effects on production traits of Israeli Holsteins. *J. Dairy Sci.* 77:1106-1113.
- Schaar, J. 1984. Effects of  $\kappa$ -casein genetic variants and lactation number on the renneting properties of individual milks. *J. Dairy Res.* 51: 398-406.
- Schlieben, S.; Erhardt, G. y Senft, B. 1991. Genotyping of bovine kappa-casein following DNA sequence amplification and direct sequencing of kappacasein-E PCR product. *Animal Genetics*. 22: 333-342.
- Solís, L. Y. R. y A. Andrade T. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares? *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica VIII (1)*: Disponible en: [www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol18num1/articulos/moleculares/index.htm](http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol18num1/articulos/moleculares/index.htm). Consultado en mayo de 2008.
- Suárez-Domínguez H. y López-Tirado Q. 1996. La ganadería bovina productora de carne en México. Situación actual. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 1-16 pp.
- Swaigood, H. E. 1993. Review and update of casein chemistry. *J. Dairy Sci.* 76:3054–3061.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphism markers. *Nucleic Acids. Research*, 12: 4127-4138.
- Terán, P. C. R. y Santillán, L. A. P. 2006. Identificación del gen de la kappa-caseína ( $\kappa$ -CN) por técnicas moleculares (PCR-RFLP), en un hato lechero del trópico ecuatoriano. Base para la selección asistida. Tesis de Licenciatura. Escuela Politécnica del ejército. Ecuador.
- Thompson A., Boland M., Singh H. 2009. Milk Proteins From Expression Food. *Food Science and Technology, International Series*. ELSEVIER. New Zealand. 1-19 pp.
- Threadgill D.W. and Womack J.E. 1990. Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. Department of Veterinary Pathology. Texas A&M University. College Station. *Nucleic Acids Research*. 18 (23):6935-6942.

- Vaiman D. 1999. The genetics of cattle. R. Fries and A. Ruvinsky (Eds) CAB International. 8: 403-406
- Van Eenennaam A.L. and J.E. Medrano. 1991. Differences on allelic protein expression in the milk of heterozygous k-casein cow's. *J Dairy Sci.* 74:1491-1496.
- Veli, E.; Rivas, E.; Rivas, V.; Verastegui, M.; Pastor, S. 2004. Evaluación de la variabilidad de genes de kappa caseína en poblaciones de bovinos criollos de Ticlos y Huaschao, región Ancash. Disponible en: <http://www.inia.gob.pe/genetica/zoogeneticos/articulo%20V%20Congreso.pdf>. Consultado en junio de 2007.
- Viana, J. L.; Fernández, A.; Iglesias, A.; Sánchez, L.; Becerra, J. 2001. Análisis de los genotipos más frecuentes de la kappa caseína en la raza vacuna rubia gallega mediante PCR/RFLPs. *Archivos de Zootecnia* 50:91-96.
- Voelker, G. R.; Bleck, G. T. y Wheeler, M. B. 1997. Single-base Polymorphisms within the flanking region of the bovine  $\alpha$ -lactalbumin gene. *J Dairy Sci.* 80:194-197.
- Voytas Daniel. 2000. *Current Protocols in Molecular Biology*. Resolution and recovery of large DNA fragments. 2.5A.1-2.5A.9.
- Walstra, P., Geurts, T., Noomen, A., Jellena, A. y Boekeel, M. 1999. Principles of milk properties and processes. Marcel Dekker, New York. 727 pp.
- Weber, J.L. y P. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics.* 44: 388-396.
- Zardowny D y U. Kühnlein. 1990. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genet.* 80: 631-634.

## ANEXO 1. MANUAL DEL KIT DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

El **Kit de Extracción de ADN Sanguíneo GF-1** está diseñado para una rápida y eficiente purificación del ADN genómico por arriba de 1 ml del total de la sangre o  $5 \times 10^6$  leucocitos. Este kit usa tubos especialmente tratados equipados con un filtro de membrana dentro de una columna para unir eficientemente el ADN en presencia de una alta concentración de sales. Este kit aplica el principio de la tecnología de giro de mini-columna y el uso de amortiguadores optimizados para asegurar que únicamente el ADN sea aislado mientras las proteínas celulares, metabolitos, sales y otras impurezas de bajo peso molecular son removidas durante los subsecuentes pasos de lavado.

El ADN genómico altamente purificado es diluido en agua o amortiguadores bajos en sales y tiene un radio A260/280 entre 1.7 y 1.9 aislándolo para usarse en muchas aplicaciones de biología molecular de rutina tales como enzimas de restricción que digieren, PCR, Southern blotting, huella genética de ADN y otras manipulaciones.

### Componentes del Kit

Producto No. de catálogo	5 preparaciones MUESTRA	50 preparaciones GF-BD-050	100 preparaciones GF-BD-100
<b>Componentes</b>			
Columnas GF-1	5	50	100
Tubos de colección	5	50	100
Amortiguador para lisis de la sangre ( <b>Buffer BB</b> )	1.5 ml	12 ml	24 ml
Wash Buffer 1 (concentrado)*	1.5 ml	15 ml	30 ml
Wash Buffer 2 (concentrado)*	1.8 ml	17 ml	34 ml
Elution Buffer	1 ml	10 ml	20 ml
Manual	1	1	1

\* Por favor etiquetar para la **Reconstitución de Soluciones y Estabilidad y Almacenamiento** antes de usar este kit.

El **Kit de Extracción de ADN sanguíneo GF-1** está disponible para 50 y 100 purificaciones por kit.

Los reactivos y materiales provistos con el kit son únicamente para propósitos de investigación.

## **Materiales Adicionados por el Usuario**

Etanol absoluto (>95%)  
Proteinasa K (20 mg/ml)  
ARNasa A (libre de ADNasa) (20 mg/ml)

## **Reconstitución de Soluciones**

El frasco etiquetado como **Wash Buffer 1** y el **Wash Buffer 2** contienen buffer concentrado el cual debe ser diluido con etanol absoluto (>95%) antes de su uso.

### **Para la MUESTRA (5 preparaciones)**

Adicionar **1.5 ml** de etanol absoluto en el frasco etiquetado como **Wash Buffer 1**.  
Adicionar **4.2 ml** de etanol absoluto en el frasco etiquetado como **Wash Buffer 2**.

### **Para el GF-BD-050 (50 preparaciones)**

Adicionar **15 ml** de etanol absoluto en el frasco etiquetado como **Wash Buffer 1**.  
Adicionar **40 ml** de etanol absoluto en el frasco etiquetado como **Wash Buffer 2**.

### **Para el GF-BD-100 (100 preparaciones)**

Adicionar **30 ml** de etanol absoluto en el frasco etiquetado como **Wash Buffer 1**.  
Adicionar **80 ml** de etanol absoluto en el frasco etiquetado como **Wash Buffer 2**.

Almacenar el **Wash Buffer** a temperatura ambiente con el tapón del frasco cerrado herméticamente después de su uso.

## **Almacenamiento y Estabilidad**

Almacenar todas las soluciones entre 20 y 30°C

Los componentes del kit están garantizados para ser estables por 12 meses después de la fecha de fabricación, el **Buffer BB** podría mostrar una precipitación de las sales debido a temperaturas frías. Si esto sucede, simplemente entibiar el frasco de 55 a 65°C ocasionalmente agitando hasta que el precipitado esté completamente disuelto.

## **Químicos Peligrosos**

El **Buffer BB** y el **Wash Buffer 1** contienen sales de guanidina las cuales pueden ser dañinas cuando entran en contacto con la piel o son ingeridas. Siempre hay que usar guantes y medidas de seguridad estándar. **NO** desinfectar la guanidina o extracción de desechos en soluciones que contienen blanqueadores o cualquier otra forma de ácido. Para limpiar cualquier artículo contaminado con el reactivo, simplemente remojar el material en detergente y agua para remover todos los residuos de guanidina antes de limpiarlos con blanqueador o con soluciones ácidas.

## Procedimientos

### Recomendación

- Todos los pasos deben de llevarse a cabo a temperatura ambiente.
- El **Wash Buffer 1** y el **Wash Buffer 2** (concentrado) deben ser diluidos con etanol absoluto antes de su uso. Por favor etiquetar para la **Reconstitución de Soluciones**.
- Si hay formas de precipitación en el **Buffer BB** incubar de 55 – 65°C con agitación ocasional hasta que el precipitado esté completamente disuelto.

Precalentar el baño maría a 65°C.

Precalentar el **Buffer de dilución** a 65°C

### 1. Lisis de la sangre

Adicionar 200µl de **Buffer BB** dentro del tubo de una muestra de sangre de 200µl en un tubo de microcentrífuga. Mezclar uniformemente utilizando el vortex. Adicionar 20µl de proteinasa K (20 mg/ml) y mezclar inmediatamente. Incubar a 65°C por 10 minutos.

*Asegurar que el Buffer BB esté mezclado homogéneamente con la muestra de sangre antes de la adición de la proteinasa K. Las muestras de sangre podrían variar en el número de leucocitos dependiendo del donador. También al procesar muchas células podrían permitir el sobrellenado de la columna. Por lo tanto, asegurarse que halla no más de  $5 \times 10^6$  leucocitos en la muestra.*

### Opcional: Eliminación de ARN

Si se requiere ADN libre de ARN, adicionar 20µl de ARNasa A (libre de ADNasa, 20 mg/ml). Mezclar e incubar a 37°C por 10 minutos.

### 2. Adición de etanol

Adicionar 200 µl de etanol absoluto. Mezclar inmediatamente y completamente para obtener una solución homogénea.

*Mezclar inmediatamente para prevenir cualquier precipitación indeseable de ácidos nucleicos debido a la alta concentración de etanol local.*

### 3. Llenado de la columna



#### Tips para un Máximo Rendimiento

*Para obtener un máximo rendimiento recomendamos a nuestros usuarios fijar fuertemente la orientación de la columna durante la centrifugación a todos los tiempos. Recomendamos a los usuarios poner una marca en el borde de la columna y así ubicar la columna con la marca a una posición fija durante la centrifugación.*

Transferir la muestra dentro de una columna ensamblada en un tubo de colección limpio (provisto). Centrifugar a 5,000 x *g* por 1 minuto. Desechar el sobrenadante.

#### **4. Columna de lavado 1**

Lavar la columna con 500  $\mu$ l de **Wash Buffer 1** y centrifugar a 5,000 x *g* por 1 minuto. Desechar el sobrenadante.

*Asegúrese que el etanol haya sido agregado dentro del Wash Buffer 1 antes de su uso (ir a Reconstitución de Soluciones).*

#### **5. Columna de lavado 2**

Lavar la columna con 500  $\mu$ l de **Wash Buffer 2** y centrifugar a 5,000 x *g* por 1 minuto. Desechar el sobrenadante. Lavar la columna de nuevo con 500  $\mu$ l de **Wash Buffer 2** y centrifugar a la máxima velocidad por 3 minutos.

*Asegúrese que el etanol haya sido agregado dentro del Wash Buffer 2 antes de su uso (ir a Reconstitución de Soluciones). Asegurar la centrifugación por 3 minutos para remover completamente el etanol.*

#### **6. Elución de ADN**

Poner la columna dentro de un tubo de microcentrífuga limpio. Adicionar 100  $\mu$ l de **Elution Buffer** precalentado, amortiguador TE o agua estéril directamente a la membrana de la columna y reposar por 2 minutos. Centrifugar a 5,000 x *g* por 1 minuto para eludir el ADN. Almacenar el ADN de 4°C a -20°C.

*Asegúrese que el elution buffer esté directamente disperso en el centro de la membrana para completar la elución. El amortiguador TE también puede eludir el ADN aunque el EDTA podría inhibir una subsecuente reacción enzimática. Si el agua es utilizada para eludir el ADN la máxima elución eficiente es lograda entre un pH de 7.0 y 8.5. Almacenar el ADN a -20°C así el ADN podría degradarse en ausencia de un agente amortiguador.*

## ANEXO 2. SECUENCIA DEL GEN CAS $\kappa$

TTCTTTAGTTTTTTCTTTGGAAAACACCAGGGTATCTGAAGAGCTCCAGTATAGATTATACCCAGTTTTGTCT  
ACAACAATCATTCAAACCTCTTTCAATCCCTTAGTTT CAGTATATTTGATATGGGGAATGTT CAGGGTCACT  
AGTATTCAAGTAAGTGTTAGACTATCAGCTCCACCAGAGCAACAATTTTTGCCTGCTTTGGTTACTAACTT  
ATCCTTAATACCTGGAGCATGCATGCATGTGTGCTCAGTCATGTCTAACTTTTTGCAACCCCATGGACAGT  
AGCCCACCAGTCTCCTCTGTCCGTGGACTTCCCAGGAAAGAATATGGAATGGGTTGCCATTTAATTCTCCA  
GGGAAGCTTCCCAATCCAGGGATCAAACCCACATCTCCTGTGTCTCCTGCATTGGCAGCAGATTTTTTACC  
ACTGAGTCACCAGAGAAGCCTAATGCCTGGAACAGAACCTGAAATACTATAAGTGCTAAAAGAATAATATC  
CAGTTTGCAAAGTTCCCAAGGCACAGATTATTGTTTTGAAGTGGATGGGAGACCCCCACCTCCTGCCCCAC  
TGTAGAAGTGTTTTGTCTTTTAGTAGGGGGAAGAATTTCTTATCCTTCCCAGGTGAAATATATTATCTTGAGA  
AAACAATCTCATTGAAGATATTTTGAGTCTATGGCATTGTGAATTAATAAAGACTCAACTATAAATCTA  
TACAATTTTATGGCTCTAAATCAGTGATTGAGAAATTATTATGTGGAATAGAAAACCTTTATAATTTAGGG  
ACTGACCAGACCTTAATCTTGCAACTATCAATTGACCCAAATGACCAAAGGAAAATGATGTGACAAAACAG  
TTTAAACAGAATGGCTGGTCTTACTGTAGCAGCTCGTGTTAGCAGTTTGGAAATTTCTGCCATCTTTCTCTT  
TTGACAGCAGAAGTCAAACCATTCTGAGAAATAGAAATTTTCAATTTACTCTGTACAAGCTGAATAAACAT  
TTTAGGGT CATGACCATCACTCTGAACATTCTAAGATATGAAATACTTCTAAGAAAAAGAGGAATACAACA  
CAATGCTGTTATTAATTCTTGTGTGATCCTGGCAGTCTACATCAATCCTGTAATAACACAATTTGGG  
GAGGACTCATTAGAAAAAATGAAATCACAGTTAACATTTTTTTGTGGAGAAATGTAAGCAAAAAGCAGATTT  
CTTTCTTAATATGTAGGAAAATTTTGGTTAGCAGTATTTTACTAAAATACCCCCATTTTGGTGGCT  
TTAAGATATATTTTTGTAAGTCAGAATAAGCCGTCTTTGAAACAGAACAATTATTCTGAATTTAGTTATT  
TAATTTTGTACATCCAGAATGATTCACCTATATTATTGAAATTTACAAATCTAAGTGAAGCAATAAATGC  
TGAAGAAGATGTGAAGAAAGGGGAATCCTCCTACACTGTTGGTGGCAATGTAAACTGGCAGAGCCACTGTG  
GAGAACATTATGGAGATTCTTTCAGAAATTAATAAAAAAAAAAATCTATGTGCAACTTGATTATAAGAACT  
AATCAATCAACAAACAGGTGTTTATATGATGAATTTACTGAAGAACAAAATGAAAATGGATCCCTACTTTA  
TATTGATTAATATTTTATATTTTATTAAACATAAATTTATTCTTGGGCATATAAAAAGATGGTCAGTTTTCT  
AATTGTTAAATACTGATGGCTGTAATTTCTAGAAAGAGGATGATCAACCACAGCCATAATATATGTAGAAT  
TACTTCATACTCAGGTTCTTGAATAATAAGAAACATTTGAAATGTAAGTGTCTATGGCTAGATACTTTT  
CATTTAATAATAGCTTTAAATTCAAATAGGTGGAATTAGTTGATTAATAATGCAATTAATATTCTTAAAAAT  
CCTCTATATCTTTTATAAACATAAAAAGTT CAGTCTTACAAAAGTGTGAATAATCTGTTTTCAAATCTTAT  
GAATGACAACCTCTATTTCTCCTCTGCATTCCATTAACCGAGACTGATGTAAGATGGCCCTGCTATCGTC  
AGATCTTTCTTTCTGTCTATCTTCTTATTGGTGAATGTAAGGGAAGATAAATCTCATGACGCAAGACAC  
TAACACCCTTTAATTAGTCTCTGGTTATTTTACCTTTGGGTGTTTCTTTACAGTGGAAAAGGCCAACTGAACCT  
ACTGCCAAGCAAGAGCTGACGGTCACAAGGAAAGTAAATCACATTAATAACATTCAAAGAGAATAATTCTT  
ATTCACAGCAGACTGTAATTATTACACCACCAAAGTTATTTTAGAAGAACATTTTCTTCTTTTGGCTTT  
TATTGTTAAGCTTGAATATCCTTTGTCTGATTATGATATTAGTTTCTAATCTAAATCTTAGATTCTGTA  
TAATGTTATGATAAAATTTATTTTAACTTCACTTTGGGTTAAAGTCAAGATTTGATACTTGCTAAAGTA  
CTGAAGACAATGTAGATTCTTAAAAAATAAATAAAGTATGTTCAAGACAGTGAATCTATTTCTACAGACA  
AATGTGGAGGGCTAACTTTTTAGGAAGATGAAAGTACAGCATAATCCAGATTGATCCCTTAATTAATTTT  
AAAATTTTATTTCTGTCTAAAGGTTATAATTTCAATTTGTCTAGTATACAACTTTAAAAAATAACAGGAC  
TTATACATCCTTCATGAAAGCTGAATAGTTCTGTTTCACAAATTTTTCTGGATTGCCAAGTTATGAAGGC  
AAATTCAGTACTTACTGTTTTAAGTAACTGATAAGAATGGTCTTATTTCTCTGGTTTCTGTTTATGCTA  
AAAAGAGAATAACTACTACCATTTTACAAGATGTTTTGTATGAGTGTGTGATATCATTTTGCATGAA  
TTATAAAAAATTCATGATTCAACATAGAAATATTGTT CAGACTACAATCTTAAAAGTTAGCCAATGCTT  
ATTGTACAATATTTTTCTATATTTCACTGTACTGTATTGTAATCATCAAGCTTAATAAGAGACTAGATAT  
TAATTTTCCAACCACAAAAAAGAAATGATAATTATGTGACATGACAGAGTTGTTAATTATCAATACAAT  
TGCAATCAAATTATGATGCACAAATACATTAATAAACATGTTAGACACATTAATTAACACAATGTTAT  
ATATTAATCTATTTCAACTAAGAAAAATTTCACTGGCAAGTGAAGAATTCATAAGGAGCTCCATTCTAT  
TCAATGAAATTTGAGGAAACAATCAGTGCTGTAGGTTGCTCAAATTTGAACTCACATTAAGTTCTTTTCC  
ATTCAGTGATATTCATCAGAGGTTCTGAAGT CAGTTTAGTAGACAGCCTTTCTAGTCATTCTTACCTGG

AAATCAAATTGAGTTGAGTCTGGTGTGCGCTCTTTATCAAGCCTGAACTTCTAACTCTGTGACCCTAGT  
CTATAAACTCAGTTTGCAGGTTTCAAGTCTATACAAGCATGATAACAATGGCTATAACAAGATGTAGTA  
TTTTAATTTATAAATGCAAGATTTATTAATATTTTAAAAATCTAAAATGTTATATGATCTTTCTAAAAAGA  
CAATTTAGCTTTTCAAATCAAATAAATAGGTATTACTACCCTATACTTGAGTCTTTAGAAAGATAAGGTT  
AATTTATTTCTTCAAATATTTTATCCAGAAAATGTAATTTGTCATATCTTACATTTTTTTCATTAATTTGA  
TCAAGCTAATTATATAAATTATGATTACTGGAGAAGCAGATTATGAAAAATGCAGTTTTCAGGATACTCCC  
CCCAATCTCTTTAAGTATTCTACTAGATCAATCACAGAATTAGAGAATTTTCAGACATTTTCAGTTCAAAC  
TTTTATTTATAGGCCAAAAGAATACTAGGGCCAGATAAAGGGAAATACTTATTCAAAGTAGAGAATAGAG  
CCCAAGATGGAGATCAGTTCTCCAAAGGAATGTGTAGTCACCTCAGTTTCTTACCTGAAGCCACTCGACT  
AGCGTTAGGAAAGCTATCTAATTTCTTTAGCCTGGCATTAAATGCCTCATCTTTCTTTGCCCTAAACTTTT  
TATCCAATTTGTCTTTCCCTTCCCTCCATTCAAATGCCCATGGATATTCTAAGGAGTTCTCTTTTCCCT  
TGAAGTTCTCGCTATTAATCTCTGCATGGGCAAGTCCCACCTATATGCTATGCTTACAGAAATAATTT  
ATTGATTTCTTAACTGAACACTTTCTATCTGTAGAACAGCACTTTTTGTGACACTTTCTACTCTTTTTATCTA  
ACAGTGATTTGTGTACATTGCAACTCTTCTAAAATTTATGTTACTTTGACCAATTCACCTTAATAAGCTC  
AACGCTGACACACAGAGCTTTGTTCTACTACGTTATTGGTACATATGAAACGAATACAGGATTAACCTT  
GTAATGACTCATTGTAACATAACCAAAAATTAATTTTATATATTTTCTACCATTTGGTTTTTCTAAAG  
CTTTTAATAAAAATAGATTTTTTTCACATTGGCTATATCTCCCCCTCATTCTGGCTTTTCCCACCCTTAAATC  
AAATAAAACATTGCTCCAAGTCACTCCTAAATTTATCAGCAACAGATCCTGTTAATCTAATGTTTTTAATTT  
TAATTTTACGTGCAATGATGAAGAGTTTTTTTCTAGTTGTGACTATCCTGGCATTAAACCCTGCCATTTTT  
GGTGAGTTAATTTTCACTAATCAGTTTGTATCAAATTTTTTAAATTTATTGAAGGGCTTTAATTTGTGTAA  
ATTTCTAAATACAGTTATATTTTATAGAACAATAAGCTACATAAGTAATTTATTTTTACATTTATTTTT  
CTTATTAAGTCATATTTCTTGGATATTCTTCTGGTCTCTAGGAATAAAGAAATCACACTTTATCATCT  
AGAGAAAACCTTTAAAATTTCTTATATGATAGAGAAAATACATTTGGGGGGAAAAATCCTGAAAATATTTT  
TAAATTATAATATGCACTTAAAATAATTCACAAAAATAAATATATAAACCATAGAGGAAGATCAGAAAT  
GTTTTTAGTTAAATTTCTATTTTTCATGCAAACCTCAAATTTGTTTCGAAACTAAATCCTTAAAATATTAGGA  
ACTTGTTTAAGCTTTTTTACCAATTTCAAATAACTTGACATGACTTTTAATATTAAAGTGTATTGTAAC  
TTTTGTTATAATATTTCCATTGTGTCAACTCCCTCAGGGATTATATCCATAAACACCTCTTTGATTTT  
TAGGCAAAACATCTGAAACCATCAGATGTTTCAATTTTCTGTTTCTTACTGTTGGCAAATAGTGCCTGGGAT  
CCCCAAATGAACATGAAAATAAAACAGACCAATAGCCAAAACAATGAGGAAAACATAGTCAAAAAAATTAA  
AAGGAAAAAACCCCAACCTTTTTTTCATATTACATGTAATTATAGTACATTACAGAGTGTAAATGCCTGAAA  
ATCATAGTTATTTATGGATACAATCCCTGAGAGGGAGTTGACAAAATATGAAGATTATAACAAGAGTTAC  
AATATATTTGAATGTTAAACATACATATCAAGTTATTTGAAATTGGTAAAAAGAAAAAGAAAAACTTAA  
ACAACATCCTAATATTTTAAAGAATTTAGTCTCTAAATAGACTGGAGTTTGTGTGAGATAGGAATTTAAT  
AAAAACATTATACATTACCATGTGTAATAATTAGATAGCCAGTGGAAATTTGCTGTATGATGCAGGGAGCT  
CAAACCTAGGACTCTGTGACAACCTAGAGGGGTAGGATGGGGTGGGAGGTGGAAGGGAGGTTCAAGGGGG  
AGGGGACATAACATACCAATGGCTGATTATTAATGTATGGCAGAAACCAACACAATATTGTAAGCA  
ATTATCCTCCAACATAAAAATAAATACATTTAAAATTTAAATATCTGATGCTGTATGACCTCCTCTTGTTT  
TGATGGGCAGGGTCTGCTCAATAAATCTTTAATCAAATTTTCTGTTAATGGGCAGGGCTGTGTTCCCTC  
CCTGTTTTTTGACCTGAGGCCAAATTTATGGTGGAGGTAATGAAGATAATGGCTGGCGACCTTCTTCAAAA  
GGTCCCATGCAAACACCCTGCACCTCAGTGCCCCCAGCCTGCAGCAGGCCACCTCTGACCGATGCCTCTG  
CCAGAGACTCCTGGACACTCATGGGCAAGTCTGGTTTCACTCTTGTGGGGTCAATGCTTCTTTCTCTTG  
GGTCTTGGTGCACACAAGCTTTTTGTTTGTGCCCTCCAAGAGTCTGTTTCTCAGTCTGTGTAAGTTCTA  
GAGGCTCTATGGTGGGGTTAATGGTGAACCTCTTCTAAGAGGGCTTATGCCATACCCAGGTCTACTGCACC  
CAGAGCTCCTGCCCAGCAGCAATCAACTGCTGACCTGTACCTCCACAGGAGACATTCAAACAAAGTTCTG  
GCTCAGTCTCTGTGGAGTCTCTGGGTCTTGGTGCATACACAGGCTTATTTGAGCCCTCAAGCATCTCTGG  
CGGGTATGGGGTTTTGATTTCTAAATGCTATTTTCAACCTTCTACCATCTTGTCTGGGGCTTCTCTTTGCCCT  
TGGACATGAGGTATCTTTCTCGGTGGGATCCAACATTTCTTCTGTTGATGGTTGTTTCAAGCAGTGTGAA  
ATTTTTGGAGTTCTTGCAGAAGATGAGCACAAGTCTTATACTCTGTAACAAACTACTTCTACTCTACAAC  
AACTGGAAAATTCATAAAGAGATGGGAATACCAGACCACCTGACCTGCCTCCTGAAAAATCTGTATGCA  
GGTCAAGAAGCAACAGTTAGAAATGGACATGGAACAACAGACTGGTTCCAAATCAGGAAAGGAGTACATC  
AAGGCTATATATTGTACCCTGATTATTAATTTATACACACAGTACATCATGAGAAATGCTGGGCTGGAT  
GAAGCACAAGTTGGAATCAAGATTGCCAGGAGAAATATCAATAACCTCAGATATGCAGATGACACCACCC  
TTATGGCAGAAAACGAAGAAGAACTAAAGAGCCTCTTGATGAAAGTGAAGAAGAGAGTGAAAAAATTTGG  
CTTAAAGCTCAACATTCAGAAAACGAAGATCATGGCATCCGGTCCCATCACTTTCATGGCAAATAGATGAG  
GAAACAATGAAACAGTGCAGACTTTATTTTTCTGGGGCTCCAAAATCACTGCATATGGTGAAGTGCAGCC  
ATGAAATTAAGAGCCTTGTCTCCTCGGAAGAAAAGCTTTGACCAACCTAGATAGCATATTAAGAAAGCAG  
AGACATTACTTTGCCAACCAAGGTCTGTCTGGTCAAAGCTATGGCTTTTCCAGTAATCATGTATGGATGT

GAAAGTTGGACTATAAAGAAAGCTGAGCACTGAAGAATTGATGCTTTTGAAGTGTGGTGTGGAGAAGAC  
 TCTTGATAATCCCTTGGACTGCAAGGAGATCCAACCAGTCTGTCTAAAGGAAATCAGTCTGAATATTC  
 ATTGGAAGGACAGATTCTGAAGCTGAAACTCCAATACTTTGGTCATCTGATGAGAAGAACTGACTCATTG  
 GAAAAGACCCTGATACTGGGAAAGATTGAAGGCAGGAGGAGAAGGGAACAACAGAGGATGAAATGGTTGG  
 ATGGCATTACCGACTCTGGACATGAGTTTAAATAAGCTCCAGGAGTTGGTGATGAACAGGGAAGCCTGGC  
 GTGCTGCAGTCCATGGGATTGCAAAGATCTGACATGACTGAGCGACTGAACTGAATTGATGACCTCCTCT  
 TAAACTGTAAAATTTGGAACAGCACTAGTCCTTGTTCATAATTCATTTATTATTAATTTAGTTTTGCT  
 TTCAAGTTAATATCTCTTAAATAATCTATTTGGTAAATTTTTAGAATCTTTTTAAAAATCTGAATTACT  
 ATGACCTTCATATTTCTTCTTTCTTTCTTTGAAATTTGATTTTATTGTGGTCACCTGCATATTTAGAAT  
 TGGGCTTTCTCTTGGGGATAGAGGTTAAAGTTTAAATCAGAAAGTGATTACAACTGCTTGACCTCTGA  
 AAACATCTTCTTGAAGTATTTAAGCCAGTGCTATCCCCAACTCTCCTTCTGTCTTACAAAGCTACAA  
 GCCCATGGATATAAACAAATAATTCAAAGAAGAATGAAAATTTATATAATTTTTACCATCCAATCTTA  
 TACAATCTTACTTACCCAATCAAATCATACAACTTAATACAGCAATCGGAGAAGGCAATGGCACCCAC  
 TCCAGTACTCTTGCCTGAAAGATCCCATGGACTGAGGAGCCTGGTAGACTGCAGTCCATGGGGTCACTAG  
 GAGTCAGACACGACTGTGTAACCTTCAAGTAGACATCCTGAGCGACTTCACTTTCACTTTTCACTTTTCA  
 GCATTGGAGAAGGAAATGGCAAGCCACTCCAGTGTTCTTGCCTGGAGAATCCCAGGGACGGGGAAGCCTG  
 GTGGGCTGCCGTCTCTGGGGTACACAGAGTCAGACACGACTGAAGTGACTTAGCAGCAGCAGCAGCAAT  
 ACAGCAATGTTGTAGCATCTTTTATGTGCTAAATGTATTCCTTCTCTCCAAAATATAAATAACTAAGATA  
 ACACCTTATTACTAGCAATTACAAGATGAACTGCACAATCTTATAGTCTACTGATGACATTATAAATTGGT  
 ATATCTTTACTGTACAGAAGTTTAAATAATTTCTGTATTTTCCCCCAAATCATATTTTTGATGGACTGT  
 TTTAAGAAATCACTGAAACTATTTAAAGGCCATTGACATCTGGGCTTCCCTGGTGTCTCAGAAAGTAA  
 AGAATCTGCCTGCATGCAGGAGACCTAGTTTTCATCCTTGGATTGGGAAGATTTCCCCGGAGAAGGGAAT  
 GGCTACCCACTCAAGTATCTTACCTGGAGAATTCATGGACAGGGGAGCCTCGTGGGCTACAGTTCATAGG  
 TCATTTTAAAAGTCCATTGATATCTATCCAGATGTTATCCATGCCTGTATTTATAATAAAAACATTTTTT  
 GATAAACCTTTAAAAGTTAACAGTAAAGAACAACATTTTCATGACATAACCATTGATTGTTTTCAACTT  
 TGAATATGCAAGTATGAAACTGAGGTGATGGAAAAATGATATGAGATCATATGCCTTTAAAAAATTTA  
 AGATACAAGTACTAAAATGAACATATACCAGGAATACATAATGCAGGTAGACTGATATATATCAAATC  
 TATATCTAAATTTTCAAGATTTTTTAGTGTAGGCAAACCTTCAATATTAATATAAATTTTTAAATTTAA  
 ACTAATGACTTAATAAATTTAGAGGTAAATAAGTCCCTGTCTTAAACACACCCTGTATTTTATTATTTTTT  
 TTAATCTCTGATATCCTATACCAACAACCTTCTAAAGGTTTATAGGATCTTTTATATCCCAGGGATATG  
 TGTGAAAAGTCTTAAACTAAAAGTGTCTTAAACTATTTACCATTATGAACTCACCTTTTGTAAAGTT  
 TTAAGCTTCATATAGATATGCCTGGAAACTACTTTCTCACTCCTGATTTCCCTATGCATGTTACAATCCA  
 GAACTAAGAAAAGTACTATAAATACATGATAATTTTTTAAATGCTATTATTTATATAACATTTATATAACC  
 AGTGTATGCTAGAGGCAATTTTTTAAATCAAGCACTGGATGGATGGATTTTTTAAATCAACCAGATGGATGA  
 TCCGGGGAGGGAGGGAGGGGATTCAGGATGGGGAACATGTGTACACCTGTAGTGGATTGATGTTGA  
 TGTATGGCAAACCAATACAATATTTGTAAGTAATTAGCCTCCAATTAATAAATAAATAAATAAATAA  
 AAAAGAAAACCTCATAAATCATCTTAGAGCAGAAACAGAAAAATATGCTAAATTTCTCCTTTATTTTTAG  
 CAATATATATTTCAATACAAATTTGAATATAGGTTGTTGATGTTCTTCATTTAAGCAATATCATATATAGTT  
 GTTGGTACAGAGATCAAATGATCATATTTCTTTCAATCTTAAATTTTTCTCCCTAAATAGTGATTTTTAA  
 GAACAATTAACCATGGGGCTCATTATTGCTATTTAAGTTAGCATGTATCTGTCAATTTCTTGGGGTTTTC  
 ACAGACTATCTGCTAAGTCACTTCAGTCGTGTCCAACCTCTGTGCGACCCCATAGACGGCAGCCACCAGG  
 CTCTCCCATCTCTGGGATTCTCCAGGCAAGAACTGGAGTGGGTTGCCATTTCTTCTCCAATGCATGA  
 AAGTGAAGAGTGAAGTGAAGTCACTCAGTCATGTTGACACTTAGTGATCCCATGGACTGCAGCCCACC  
 AGGCTCCTCCATCCATGGGATTTTCCAGGCAAGAGTACTGGAGTGGGGTGCCATTTGCCTTCTCTGTACA  
 GACTATAGATAACCTAGAAAAGTGCTTTATAATATTTTACAATACTAAAATAAAGCAAGAAAAACATGT  
 TTTATCTTTTTTATAAAGATATTTTTAAATCACAAAAACTAGACTCTATCATGCTTTTTTTTTCTTCTAAC  
 TTCTTGTTTTCTGATTCTTTCTCTGAATCTCAACAGGGTGCCAGGAGCAAAACCAAGAACAACCAATAAGT  
 AAGTTTGTTCAGTAGAGATATGAATCCAAAGAATAAAAATTTCTGCAAAGTTTAAATGATATTAATAAGCC  
 TTCTATCAAAAGACTAAGTAAATATTTAAACTACATAAAATAGTTGAATAATCTTTGTAAAAATAATCAT  
 TTCAGCAACCATTATATGAATCCACATCAATGTTTATCTAAAATCTTGGTATCACTTTACAGGCCAAGT  
 CGTGTGATTTTTCATGAGTATTTAGCAACATGAGAAAACCTTCTCAGAATTTAATACTGGGAAAACAATG  
 AAAACAAAAGCAAAGCTTAATATTTTTTCTGTCTACTTTTTAAGAAATGGGGAATGATCCCTCTCTGAAA  
 CATCTTCAGATGCTTCTCATACAATTTGATTCATTCCCCAGTTTTGTTTGAATGAATACCTTTAAATATG  
 TCTCCTTTTATGAGAAAGCCTTGTCTTGGGTATAATTTTATTAAATTTGTTTCTATTTCATAAGGAAAGAT  
 CTAATGATTTTTGTATTTTATAACTGTACCTAATTAATATTAATTAATAGAATAATCAATTATTATAATT  
 AGTTAATTATAATATAATATTATATATATCACATGATGTGATGTGATGTGGAATATATATATTTATCATA  
 TAATATGATATTATGTGATATATATCACATTATATCACAATATATCACATGACGTGATGTGGAATATATA

TTATATTATTATATAGTTTTATATAATATATATTAATAATTGATTAGTTCTATTACTTTGGCCACCTGAT  
 GTGAAGAGCTGACTCATTTGAAAAGACCCTGATGCTAGGAAAGATTGAGGGCAGGAGGAGAAGGGGACGA  
 CAGAGGATGAGATGGTTGGATGGCATCATGGACTCAATGGACATGGGTTTGGGTGGACTCCAGGAATTGG  
 TGATGGACAGGGTGGCCTAGTGTGCTGCAGTTCATGGGGTGCAGAAAGAGTTGGACACAACCTGAGCGACTG  
 AACTGAACTGAACTGAATATATAATATATAAATATTATAATATTATATATAATATATAATTATAAAAATTTT  
 ATAAATTATATAAAAAATATATAAACCCAGAATCCATATCACATCACATCATTACATATAATATATAAT  
 ATAATGTATAATATAATTTATAATATTAGATGATTATATAATATACAGTATTAATATATTAGTATATAAT  
 ATAATTGTATATAGTTAACTGCACCTAATTAATGTATTTTATGACTGCACCTAATTGATAGAACTGTGGC  
 AAATAAAGATGGAAAATTTCTAACTGATTTTAAACGGATAAAAATAAGCAGAAAAAACCCCAACATA  
 TAAACCCAGGAATCCACATCACATTTACTATTTTACTATTTTCTTGAATTAAGTTTATAGATAAAAATCCCTT  
 AACCTAATCCCTAGATAAAAATAAAAACAATTAACAACATGTGGTGAATAAACATATATATATA  
 TATATATATACACACACACATATACACACTCATATATATGGAAAGAGATATACAGTTTTTTTTCTTTGT  
 GTGTAGTATGCTTGTGTATTGTATGTCAAAGCTCTCTATGAACTGGTCTAGCTGTGGTCTTATAAAGT  
 GCAACATTTACTGAGCACTTTTTATATATGCCAAGCTCTGGGCAAAGTGGTTTACATTATGAGCTATCTC  
 ATCTAATTTTTTTTTGAACTAATGTTATTTTTAATATTTGCTGAAAATCAAGAAGTGAAGGAAGATGTA  
 CAAATCCATATTTTATAAATAATATGGTTTCTGGGTTCACTATCCCAATGTTGTACTTTCTTAACATC  
 AAATACTGTAACAATTTGTTTCAAAAATTTCTGATTTAAGATATCTCTTCACTCTGCTTCTGCTGCTGCT  
 AAGTCGTTCCAGTCTGGCTGACTCTTGCACCCCATAGATGGCAGCCCACTAGGCTCCCCAGTCCCTGG  
 GATTCTCCAGGCAAGAAATAATACCATTCTGCATAATTTATTTTTTACAGCGCTGTGAGAAAGATGAA  
 GATTCTTCAGTGACAAAATAGCCAAATATATCCCAATTCAGTATGTGCTGAGTAGGTATCCTAGTTATGG  
 ACTCAATTAACCAACAGAAACCAGTTGCACTAATTAATAATCAATTTCTGCCATACCCATATTATGCA  
 AAGCCAGCTGCAGTTAGGTACCTGCCCAATTTCTCAATGGCAAGTTTTGTCAAATACTGTGCCTGCCA  
 AGTCTGCCAAGCCCAGCCAACCTACCATGGCAGTCAACCCACACCCACATTTATCATTATGGCCATTCC  
 ACCAAAGAAAAATCAGGATAAAACAGAAATCCCTACCATCAATACCATTGCTAGTGGTGAAGCTACAAGT  
 ACACCTACCATCGAAGCAGTAGAGAGCACTGTAGCTACTCTAGAAGCTTCTCCAGAAGTTATTGAGAGCC  
 CACTGAGATCAACACAGTCCAAGTTACTTCACTGCGGTCTAAATACTCTAAGGAGACATCAAAGAAGA  
 CAACGCAGTTAAATAAGCAAAATGAATAACAGCAAGATTCAATGACTTATTAATAAAAATCGTAACATCT  
 AAAGTAGCGTAGATGGATAAATTAATCTCTGTTACAGAGAAGGCGAAATGGGCCTAATTATAACTTACATTT  
 GCTGGTTCTTTATCATGTATATACTAGATTCTTTCCCAACAAGAAAGTTTTAAATATTTTTACAAAATGA  
 GTAAAAATGCAGATTTTATTATTAACCTTTTTCAACAATGGTATACTCCTTGAATCTATTAGTTTTTA  
 TTTTACTCCTGTTACACACAAAAACAGTAAATACAGTGTCAACTCATGATTTTTCTTATCTCAAAAAT  
 ATGTTTTCTTAGAAAAAATCATATAGGATATGAGTTTAAATATATTTAATTGTATACCAGTGTGTG  
 CACTCTACTTTTGGTAAGAATAGAATGAAAGGAAACAATGTTTCACTCATAGCATTATCTCAGGCATC  
 ACTTCTGAAAGGATGTATAAGGTTAGGCACCCAAATTTCTCCTATTGTAAGGTAATCCCACAGAAAAAT  
 CTAATTTTTAACTTGAAGGCACCTACTTATTAAGAGGAACTTTCAGAATTTAAATATAATGTAAAT  
 ATGTCTATTTATTATTTGAATCAATGGATAATGGCAGAGTCCAAAATAATTTAAAACACATGAAGAGGTT  
 AAACAGAAAGATCAATAAGATAGAAAATAACTAAAGATTGTGAAATAATTTAGGAAGAAAGTGACAACAT  
 TTTGAGAGTCTAGGCAACAAATACTTTTATCACACTGTCTACATGATTTTTGGTCTAAAATGAACTCAGC  
 ATGATATAATGGTAATAGCAATAGATCAGAGAAGCCTGGTTCTTCTGTTGTGTGACTTTAAGCAATTCAT  
 TACTCTCTCTAAGAGTCACTACTCTATTTTCTCATAATTTTGGTTGCTATGAGATTCAAGTGAAGAA  
 CATATTGTGAATGAGATGTAAAAAGCAATCAATCTGTGAAATATAATGCTCTAGAAAAGAAGTATAATTA  
 GTAAATATTTAAATTTACTTTCAACTAAAATATCAAGTCTTACTAAATTTACAAAACATAACAATC  
 TCAGTTTAAATCCTGTAGCAGCCATATGGAATGGATTATATTACCATCTTAAATCCACAAATGAAAGCTAT  
 GGATGCAGATTGCTACAGCTGAAAGTTCAAACTGGAACCAAAATCAAATCTGCTTGAATTCAGATAGTA  
 AGGCTTAAATAGTACGTCTGCTATTTCCATATGGCTATTTGTTAAAAAAAATAAAAAATAAAAACAGAAA  
 ACATACTCTAATTTTCCAAGATCAGCATATGTGTAATTTTACTGAGATTGTGTTAATAGGACATC  
 TGGTAAGAAAGAGAAGATAATAAGCTGATAAATCTTACTCATTAAAATTTCAAAAAGAAAATGAAAA  
 ATTAATGGACACAAAATGAAAACAAGTAATGAGTATGCAACTATCTATTTTATTGATATGAAATACATT  
 ATATTTACATGATTGTTTTTAATAAAAATAATCATTATCTCAATAGTCAACATTTGTTCAAACTCAAGAA  
 CCTAGATTCTAAGTTAAAACCACACACTATAAGATCACTTATAAAAAAGAATGTATAGGACTGTGTCT  
 TTCTGTGAATATTAGATGAAGACAATTTGTATCAGTTCATATGTGGTGAATTTAAATATTTAAATTTATA  
 TATTTAGTTAGATAAACTACTTGGATACAGACATGAAGCAAATCACAGAAGCTAAATAAAAATACATATCA  
 TGAGAAGTGTAGCACATTTGTAAGTAAATCTCTAACTGTCAATTTTTATAGTCTAGCTGAAACCAAT  
 GACTACTTCAAATTTCTTTGGCCAGTTGTCTGCCTTCGGTGAACAGAGAATATGATTTTACAGATCT  
 GGCTCCTTCTCGTCTCCTCTTACATTTTACTTTTTATGCCAGATTTAATTTTTTATTCTGCATAATAA  
 AGCCAATCAAATGCATGGATCTCTTTCTTTTTAATTTATTTAATTTAATTGGAGGCTAATTACTTTA  
 CAATATTGTATTGGTTCTACCACACATCAACGTGAATCTGCCACGGGCATACACGTGTTCCCATCCTGA

Exones

Intrones

ATCATTATGGCCATTCCACCAAAG MB002F

TCTGTTACAGAGAAGGCGAAATGGGC MB002R

### ANEXO 3. “ALLELIC AND GENOTYPIC FREQUENCY TO CASEINA KAPPA GENE IN DOUBLE PURPOSE IN BOVINES”

#### “FRECUENCIAS ALELICAS Y GENOTIPICAS DEL GEN KAPPA CASEÍNA EN BOVINOS DE DOBLE PROPÓSITO”

J. Abad-Zavaleta<sup>1\*</sup>, S. Del Moral<sup>2</sup>, N.G. Cortés López<sup>2</sup>, C. Luna-Palomera<sup>3</sup>, J.A. Rueda Barrientos<sup>1</sup> y C.A. Meza-Herrera<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidad del Papaloapan. Av. Ferrocarril s/n, Col. Ciudad universitaria, C.P. 68400, Loma Bonita Oaxaca, México. Tel. (281) 872-22-37, ext. 220, \*E-mail:

*jabad@unpa.edu.mx*

<sup>2</sup>Universidad del Papaloapan. Instituto de Biotecnología. Calle circuito central No. 200, Col. Parque Industrial. CP. 68301. Tuxtepec, Oaxaca, México. Tel. (287) 87 59 2 40, ext. 220.

<sup>3</sup>Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. División Académica de Ciencias Agropecuarias. Av. Universidad S/N, Col. Magisterial, Villahermosa, Tabasco, México. Tel (993) 35-8-15-85.

<sup>4</sup>Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Bermejillo, Durango, México. (872) 77-6-01-60, *cmeza2020@hotmail.com*

**Correspondencia\***

#### RESUMEN

Con el objetivo de determinar las frecuencias alélicas del gen *CAS $\kappa$*  en bovinos de doble propósito y generar recomendaciones prácticas sobre selección de individuos homocigóticos para la variante deseable BB, se tomaron muestras de plasma sanguíneo a 200 bovinos y se depositaron en tubos con EDTA (anticoagulante). A partir del material genético extraído, se amplificó el marcador MB002. Las pruebas de RFLP's se realizaron utilizando la enzima de restricción *Hinf I* para el diagnóstico de los alelos A y B del gen *CAS $\kappa$* . Las frecuencias genotípicas obtenidas correspondieron a 0.34, 0.01 y 0.65 para los homocigotos AA y BB, y para el heterocigoto AB, respectivamente. Las frecuencias alélicas fueron 0.67 y 0.34 para el alelo A y B, respectivamente. Así mismo, se observa una heterocigosidad media de 0.6481. La población en estudio no se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg, el valor de  $\chi^2$  fue 21.93 con 2 grados de libertad (P=0.999).

**Palabras clave:** Bovinos de doble propósito, frecuencias genotípicas, *CAS $\kappa$*  BB

## INTRODUCCIÓN

La leche contiene carbohidratos, lípidos, proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales, vitaminas, elementos inorgánicos y agua. Las proteínas lácteas están divididas en la fracción soluble (proteínas del suero), como la  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La) y la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg); y en la fracción insoluble (caseínas totales), la  $\alpha$ -s1 ( $\alpha$ s1-Cn), la  $\alpha$ -s2 ( $\alpha$ s2-Cn), la ( $\beta$ -Cn) y la  $\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -CN), donde las caseínas se encargan de retener la grasa en la leche formando una emulsión (Thompson *et al.*, 2009; Formaggioni *et al.*, 1999).

Todas las caseínas presentan un polimorfismo genético que consiste en la sustitución de uno o dos aminoácidos y rara vez en la supresión de un segmento. La variante o variantes presentes en la leche están determinadas por la genética Mendeliana. La presencia de determinadas variantes genéticas en la leche tiene un efecto importante sobre las propiedades de coagulación de la leche (Corral *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2000; Fox *et al.*, 2000; Formaggioni *et al.*, 1999; Freyer *et al.*, 1999).

La  $\kappa$ -CN es importante en el rendimiento del queso debido a su participación en la estabilización de la formación de micelas, previniendo la precipitación de las caseínas de la leche. Las caseínas están codificadas por un grupo de genes autosómicos que se encuentran ubicados en el cromosoma 6 en la posición 6q31-33 con un tamaño de 250 kilobases (kb) (Requena *et al.*, 2007; Corral *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2000; Fox *et al.*, 2000; Formaggioni *et al.*, 1999; Freyer *et al.*, 1999). El gen que codifica para la  $\kappa$ -CN está conformado por 5 exones y 4 intrones (Cervantes *et al.*, 2007; Requena *et al.*, 2007; López y Vásquez, 2004; Medrano y Córdova, 1990) (figura 1 y 2).

En la  $\kappa$ -CN las variantes alélicas A y B son las más frecuentes y están presentes en todas las razas con frecuencias variables, sin embargo otras variantes han sido descritas (C, E, F o G) en diferentes regiones del mundo (Requena *et al.*, 2007; Barroso *et al.*, 1998; Horne y Muir, 1994). La leche derivada de animales con la variante B presenta mayor proporción de  $\kappa$ -CN, micelas pequeñas, un contenido proteínico más alto, mayor estabilidad al calor y a la congelación, menor tiempo de coagulación, un cuajo más consistente y 5 a 10% más de rendimiento quesero, en comparación con la leche de los animales que presentan el gen  $CAS_{\kappa}$  A (Requena *et al.*, 2007; Barroso *et al.*, 1998; López, 1998; Horne y Muir, 1994), siendo esta característica de gran importancia para la industria láctea. La mayor frecuencia del alelo B ha sido una característica común en la mayoría de las poblaciones de ganado productor de leche que se ha estudiado (Osta, 1994; Zardowny y Kühnlein, 1990), excepto en la raza Holstein, donde el alelo A es más frecuente (Viana *et al.*, 2001; Bonvillani *et al.*, 2000).

El marcador molecular MB002, también conocido como JK5-JK3, se ha utilizado en diversos estudios para identificar las variantes alélicas A y B. Este marcador se encuentra localizado entre el exón 4 e intrón 4-5 (figura 1 y 2) con un tamaño de 350 pb (Cervantes *et al.*, 2007; Requena *et al.*, 2007; López y Vásquez, 2004; Medrano y

Córdova, 1990). Se puede discernir entre el alelo A y B utilizando la técnica de PCR-RFLP a través de la enzima *Hinf I*.

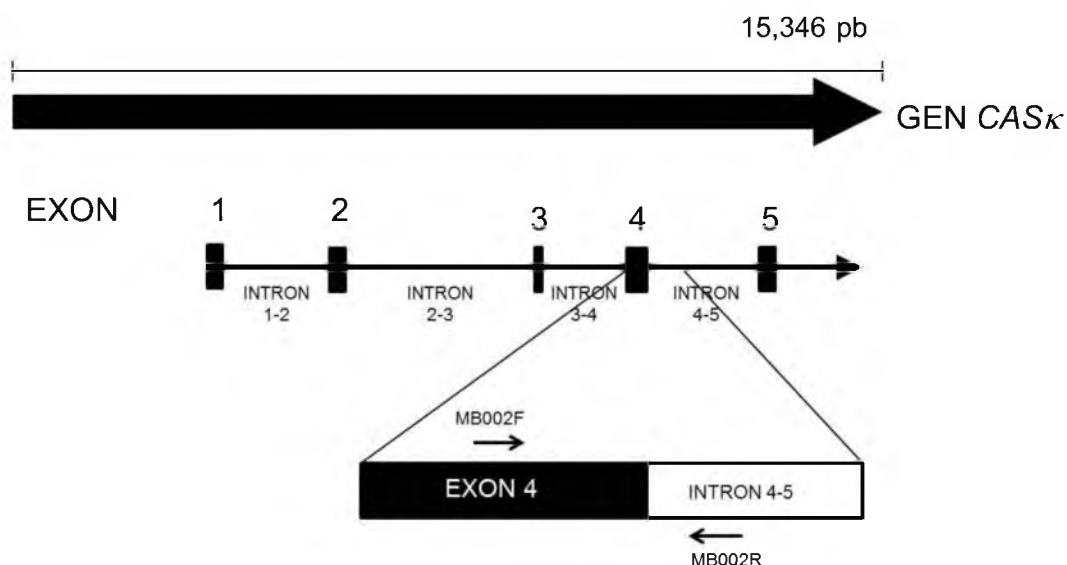


Figura 1. Regiones exónicas e intrónicas del gen *CASκ*

El ganado de doble propósito es un término que se ha usado en el cruce de razas de origen Cebú x Criollo o razas europeas, utilizado para producir carne y leche en áreas tropicales. Los cruces de este ganado en la región del Papaloapan, se hacen indiscriminadamente debido a la falta de orientación hacia un objetivo de producción. Ocasionalmente se utilizan sementales genéticamente superiores, sin embargo muchas otras veces solo se utilizan individuos que presentan un fenotipo a gusto del productor, sin perseguir un objetivo en particular.

El ganado de doble propósito, es un grupo genético que se ha adaptado a las condiciones climáticas de calor, humedad, baja calidad de pastos y parásitos que prevalecen en la región tropical. La producción de este sistema es baja, comparada con los sistemas intensivos de producción de leche y carne especializados, sin embargo, ofrece ventajas sobre los grupos genéticos especializados, en las condiciones que se explota. Además, el manejo se hace generalmente con bajos insumos y escaso uso de tecnología (Ortega y Ward, 2005).

Dado que la variante B es la más deseada por las características fisiológicas de la leche, el objetivo de este trabajo fue determinar las frecuencias alélicas del gen *CASκ* en bovinos de doble propósito y generar recomendaciones prácticas sobre selección de individuos homocigóticos para la variante deseable BB.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Toma de muestras de sangre

Se tomaron muestras de plasma sanguíneo de la vena yugular (3-5 mL/animal) a 200 bovino de doble propósito, la muestra representativa fue al azar, del 10% del total de animales de 25 ranchos ganaderos muestreados en la región de Tuxtepec y Loma Bonita, Oaxaca, México. El plasma sanguíneo se depositó en tubos que contenían EDTA como anticoagulante. Una vez obtenido el plasma, se transportó y almacenó a – 20 °C en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, hasta su procesamiento.

### Extracción de ADN

Se utilizó el **Kit de Extracción de ADN Sanguíneo GF-1 (Vivantis®)**, usando las indicaciones del proveedor.

### Amplificación del ADN

Los fragmentos de ADN se amplificaron por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las amplificaciones del marcador molecular MB002 del gen *CAS $\kappa$*  se realizaron con la enzima Accu Prime Taq DNA polymerase System (Invitrogen). El volumen final de reacción fue de 10  $\mu$ L, adicionando 0.2  $\mu$ L de “Accu Prime Taq DNA polymerase System”, 1  $\mu$ L de “Accu Prime PCR Buffer II”, 0.1  $\mu$ L de Oligonucleótidos (10 pM), 100ng de DNA.

Las reacciones se realizaron en el termociclador MAXYGENE (AXYGEN Scientific®).

El marcador MB002 fue amplificado a partir de ADN genómico bovino aislado, usando los oligonucleótidos MB002 F (ATCATTTATGGCCATTCCACCAAAG) y MB002 R (GCCCATTTTCGCTTCTCTGTAACAGA), bajo las condiciones siguientes de reacción; 1 ciclo 94 °C 5 min; 30 ciclos 94 °C 1 min, 56.1 °C 30 s y 72 °C 30 s; 1 Ciclo 72 °C 10 min.

Los fragmentos de ADN se separaron en un gel de agarosa al 2%, las muestras se cargaron con un amortiguador de carga SBX 6X (40% sacarosa, 0.25% bromofenol y 0.25% xilencianol). El gel de agarosa se tiñó con Bromuro de Etidio al 0.5% y se observó en un sistema de fotodocumentación (INGENIUS SYNGENNE®).

### Genotipificación

Las pruebas de RFLP se realizaron utilizando las amplificaciones del marcador MB002 y la enzima de restricción *Hinf I* (Fermentas®). El marcador se digirió con la enzima de restricción *Hinf I* por 2 h a 37 °C, donde a la mezcla del producto de PCR (10  $\mu$ L) se le adicionó 10 U (1  $\mu$ L) de la enzima *Hinf I*, 2  $\mu$ L de 10X Buffer R y se aforó a 30  $\mu$ L con agua estéril (figura 2). Los fragmentos digeridos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 3%. Las bandas se visualizaron en un sistema de fotodocumentación (INGENIUS SYNGENNE®).

### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la variabilidad genética se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas, y el equilibrio de Hardy Weinberg con la prueba de  $\chi^2$  (Ji cuadrada).

## RESULTADOS

El producto de PCR del marcador MB002 se amplificó a partir del DNA genómico con los oligonucleótidos MB002F y MB002R, obteniéndose un fragmento amplificado de 344 pb.

De las 200 muestras analizadas solo 108 amplificaron el marcador MB002. Como se observa en las figuras 1 y 2, el marcador genético MB002 se encuentra situado en el exón 4 y el intrón 4-5. Se ha observado que las regiones intrónicas son poco conservadas entre las variantes alélicas (Cervantes *et al.*, 2007; Requena *et al.*, 2007; López y Vásquez, 2004; Medrano y Córdova, 1990). Además existen diversos reportes que muestran también una alta variabilidad en el exón 4, dada la variabilidad exónica e intrónica, es posible que los oligonucleótidos MB002 F y R, no hayan encontrado la región complementaria y por ello la amplificación del marcador MB002 no fue positiva para las 92 muestras. Por lo tanto es posible que las 92 muestras contengan otra variante alélica diferente a las analizadas en este trabajo. Actualmente se está buscando que variantes alélicas poseen las 92 muestras restantes.

Para aquellas muestras donde amplificó el marcador MB002 se utilizó la enzima *Hinf I* (figura 2) para digerir el producto de PCR, observándose los patrones de restricción 131/132 y 81pb para el alelo A y 263 y 81 pb para el caso del alelo B. Con base en lo anterior, como se observa en la figura 3, los individuos con el genotipo AA (carriles 4, 8 y 9) presentaron dos fragmentos de 131/132 y 81pb, los individuos con el genotipo BB (carril 10) presentaron dos fragmentos de 263 y 81 pb y los individuos con el genotipo AB (carriles 2, 3, 5, 6 y 7) presentaron tres fragmentos de 263, 131/132 y 81 pb, aproximadamente.

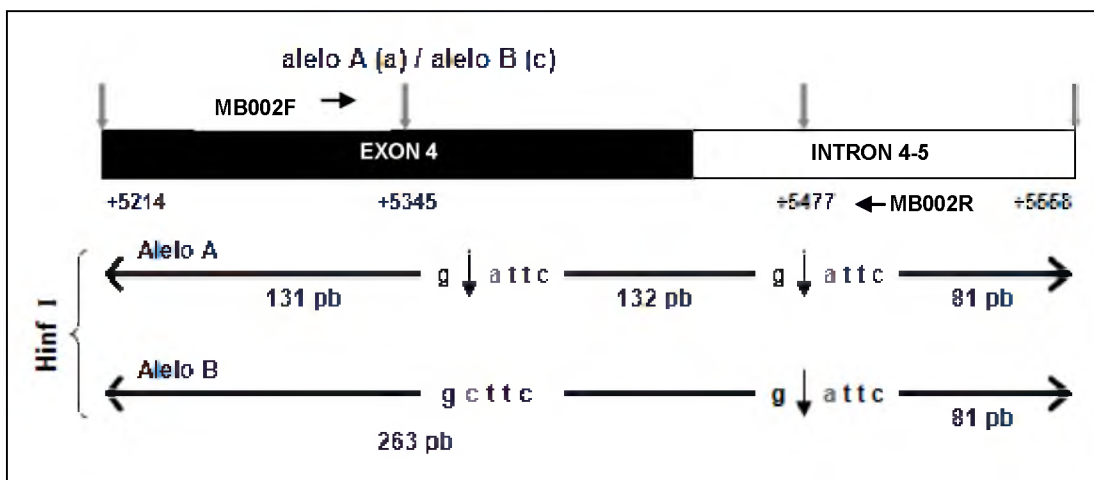


Figura 2. Patrón de restricción del marcador MB002 utilizando *Hinf I* en el producto de PCR de 344 pb (adaptado de López y Vásquez, 2004).

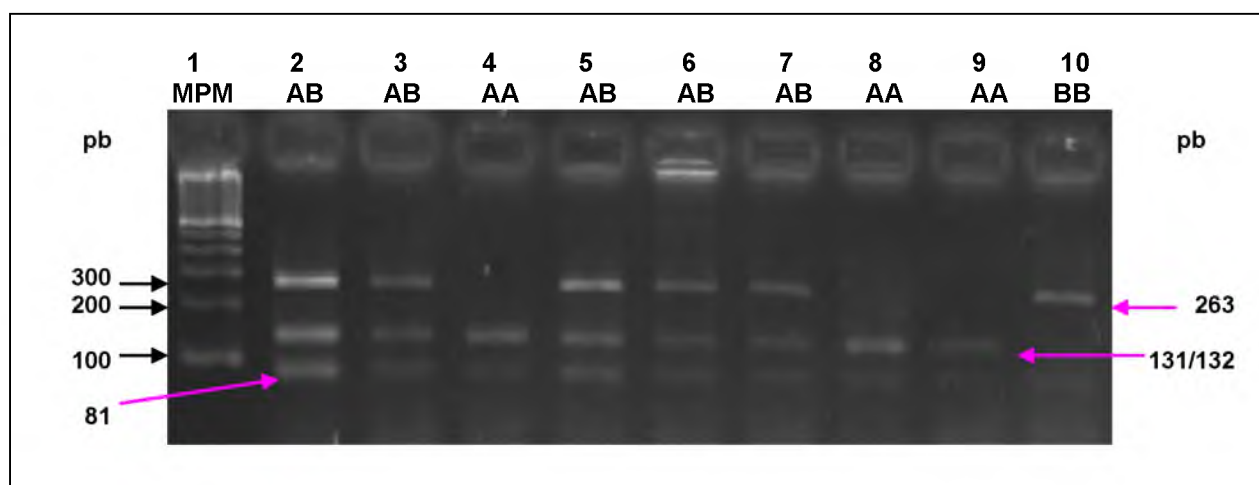


Figura 3. Genotipificación del gen  $CAS\kappa$  en bovinos de doble propósito, con electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

En la tabla 1 de este trabajo, se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas y esperadas de la población analizada de bovinos de doble propósito. Las frecuencias genotípicas obtenidas correspondieron a 0.34 para el homocigoto AA; 0.65 para el heterocigoto AB y 0.01 para el homocigoto BB. Se observaron frecuencias alélicas de 0.67 para el alelo A y 0.34 para el alelo B. Así mismo, se observa la heterocigosidad media de 0.6481. La población en estudio no se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg, el valor de  $\chi^2 = 21.93$  con 2 grados de libertad ( $P=0.999$ ).

Como se puede apreciar, en este estudio, el alelo A del gen  $CAS\kappa$  fue más predominante, presentando una frecuencia de 0.67 mientras que la del alelo B correspondió a tan sólo 0.34.

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas en bovinos de doble propósito

Genotipo	Observado		Esperado ( $p^2$ $2pq$ $q^2$ )		Alelos	Frecuencias Alélicas
	Número de individuos	Frecuencias genotípicas	Número de individuos	Frecuencias genotípicas		
AA	37	0.34	48.00	0.44	A	0.66
AB	70	0.65	49.33	0.45	B	0.34
BB	1	0.01	12.68	0.11		
Heterocigosidad						
		0.6481				

Comparando las frecuencias alélicas del gen  $CAS\kappa$  A y B de este trabajo con algunas razas de bovinos, se encontró que las frecuencias del alelo B, son superadas por las razas productoras de leche, Jersey, Pardo Suizo y Normanda con 0.77, 0.57 y 0.56 respectivamente, contra 0.34 en bovinos de doble propósito, sin embargo, nuestros resultados fueron superiores a lo encontrado en bovinos de las razas Cebú, Holstein y Gyr con 0.26, 0.10 y 0.07, respectivamente (tabla 2).

Tabla 2. Frecuencias alélicas de  $CAS\kappa$  reportadas en algunas razas de bovinos

Raza	Frecuencia alélica		Referencia
	$CAS\kappa$ A	$CAS\kappa$ B	
<i>Bos taurus x Bos indicus</i>			
Doble Propósito	0.67	0.34	Este estudio
<i>Bos taurus</i>			
Jersey	0.23	0.77	Grosclaude, 1998; Van-Eenennaam y Medrano, 1991; McLean <i>et al.</i> , 1984
Pardo Suizo	0.43	0.57	Cervantes <i>et al.</i> , 2007
Normanda	0.44	0.56	Grosclaude, 1998; Van-Eenennaam y Medrano, 1991; McLean <i>et al.</i> , 1984
Guernsey	0.73	0.27	Van-Eenennaam y Medrano, (1991); Voelker <i>et al.</i> , (1997)

Shorton Lechero	0.89	0.11	Van-Eenennaam y Medrano, (1991)
Holstein	0.90	0.10	Viana <i>et al.</i> , 2001
<i>Bos indicus</i>			
Cebú	0.74	0.26	Cervantes <i>et al.</i> , 2007
Nelore	0.91	0.09	Kemenes <i>et al.</i> , 1999
Guzerá	0.92	0.08	Kemenes <i>et al.</i> , 1999
Gyr	0.93	0.07	Kemenes <i>et al.</i> , 1999

## DISCUSIÓN

Existen estudios sobre la variabilidad genética del gen *CAS $\kappa$*  en diferentes razas de bovinos lecheros (Viana *et al.*, 2001; Kemenes *et al.*, 1999; Grosclaude, 1998; Van-Eenennaam y Medrano, 1991; McLean *et al.*, 1984) donde las razas lecheras especializadas son las más estudiadas, sin embargo no todas se caracterizan por su calidad en leche. La raza Holstein, se caracteriza por sus altos volúmenes de producción de leche, pero, es catalogada de baja calidad debido a su baja concentración de sólidos totales, grasa y proteína (Benavides, 2003), mientras que la raza Jersey se caracteriza por volúmenes de leche inferiores a los de la raza Holstein pero la calidad de su leche es muy superior a ésta y a varias razas lecheras (Grosclaude, 1998; Van-Eenennaam y Medrano, 1991; McLean *et al.*, 1984), el principal inconveniente de la raza jersey es que su explotación está limitada a ciertas condiciones climáticas. Todo esto ha generado expectativa sobre mejores alternativas en cuanto a la producción de leche con calidad en otras razas de ganado (Munizaga *et al.*, 2004), resaltando las características del ganado bovino de doble propósito, el cual es ampliamente utilizado como ganado productor tanto de leche así como de carne en las regiones tropicales con alta temperatura y porcentaje de humedad, dando buenos resultados en su explotación.

Existen reportes que indican que la diversidad genética del gen *CAS $\kappa$*  en el exón IV ha sido subestimada en el ganado doméstico por lo que es necesario secuenciar el exón IV (Chen *et al.*, 2008) con la finalidad de conocer los haplotipos en el ganado de doble propósito y así determinar las variantes alélicas de las 92 muestras que no amplificaron para el marcador MB002.

En distintos estudios de caracterización de razas bovinas se ha observado que el alelo B presenta mayores frecuencias en razas *Bos taurus* que en razas *Bos indicus* (Golijow *et al.* 1999; Kemenes *et al.*, 1999; Tambasco, 1998; Del Lama y Zago, 1996;

Barker y Manwell, 1980). Así mismo, el ganado de doble propósito se originó de la mezcla de ambos, *Bos taurus* y *Bos indicus* y en este estudio predominó el alelo A sobre el alelo B (0.67 y 0.34, respectivamente). Aunque solo un individuo presentó el genotipo BB, también los animales que resultaron heterocigotos (AB) poseen la variante alélica B, dado estos resultados, es posible que la calidad de la leche tenga un mayor contenido de sólidos totales, incluyendo proteína, en comparación con los individuos que presentaron la variante alélica A.

Van-Eenennaam y Medrano (1991) demostraron que la variante alélica B tiene un mayor nivel de expresión con respecto a la variante alélica A en la glándula mamaria y por lo tanto, la proporción de  $\kappa$ -CN en la leche depende del genotipo del animal, en el siguiente orden BB > AB > AA, llegando a tener una diferencia proteica del 3% entre los animales con la variante alélica B contra los animales con variante alélica A.

Las frecuencias obtenidas de la variante alélica B (0.34), en este estudio, superan a lo encontrado en otras razas, tal es el caso de la raza Guernsey (Van-Eenennaam y Medrano, 1991; Voelker *et al.*, 1997), la raza Shorton lechero (Van-Eenennaam y Medrano, 1991), la raza Holstein (Viana *et al.*, 2001), las razas Cebú (Cervantes *et al.*, 2007), las razas Nelore, Guserát, y Gyr (Kemenes *et al.*, 1999) con valores de 0.27, 0.11, 0.10, 0.26, 0.09, 0.08 y 0.07, respectivamente. Por otro lado, en diversas razas (Holstein, Irish-Friesian, Dutch-Friesian, Limousin, Montbeliarde, Charolais, Normande, Norwegian Red and Kerry) se ha reportado que el alelo A es dominante en todas: lecheras, de carne y de doble propósito, con una frecuencia alélica del 0.80, siendo más alta en razas lecheras (0.75). Así mismo, el genotipo AB es escaso en ganado lechero (0.11), comparado con el ganado de doble propósito y productor de carne (ambos 0.62). El genotipo BB es aún más escaso (0.095) aunque es mucho más alto en animales de doble propósito (0.18) que en animales lecheros (0.56) (Keating *et al.*, 2007). Con base en los resultados obtenidos de las frecuencias alélicas de  $CAS\kappa$  B (0.34) en este estudio, el ganado de doble propósito puede resultar atractivo para su explotación como bovinos productores de leche, por su calidad lechera, bajo el esquema en el cual se maneja y explota y sobre todo por su fácil adaptación a las condiciones climáticas del trópico mexicano.

Como se muestra en la tabla 1, las frecuencias genotípicas (AA, AB y BB) observadas y las esperadas bajo la condición de equilibrio génico, no son iguales a  $p^2$ ,  $2pq$  y  $q^2$ , en consecuencia, la población no se encuentra en equilibrio y no existe cruzamiento al azar para este *locus*. Así mismo la heterocigosidad (0.6481) nos indica una alta heterogeneidad de la población en estudio, resultado de los cruzamientos indiscriminados debidos a la falta de orientación de los ganaderos hacia un objetivo de producción.

Finalmente, mediante la técnica PCR-RFLP, herramienta sencilla y de bajo costo, se pueden identificar aquellos animales portadores de la variante alélica B, con ello realizar programas de mejoramiento genético mediante cruzas dirigidas, con la finalidad de obtener animales con mejor calidad de leche, contribuyendo al desarrollo económico de la región. Además, el tiempo desde la obtención del plasma sanguíneo hasta la identificación del genotipo por medio de PCR-RFLP ofrece grandes ventajas sobre el tiempo que se requiere para evaluar a un animal por métodos convencionales.

## CONCLUSIONES

A través de la amplificación y genotificación del marcador MB002 es posible identificar las variantes alélicas A y B del gen *CAS $\kappa$* . En este trabajo se encontró que solo 108 individuos de los 200 muestreados amplificaron el marcador MB002, es posible que los 92 animales restantes contengan otra variante alélica diferente a las estudiadas en el presente trabajo. Actualmente se buscan que otras variantes alélicas se encuentran presentes en la población estudiada.

Además en la población estudiada se observó que el alelo A predominó sobre el alelo B, obteniendo una frecuencia de 0.67 sobre 0.34, respectivamente.

Los bovinos presentaron el genotipo *CAS $\kappa$*  AA (34%), AB (65%) y BB (1%). Así mismo, la población no se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg.

La alta frecuencia de heterocigotos (AB) en contraste con la casi nula frecuencia de homocigotos BB, se debe a las cruzas indiscriminadas y a la poca orientación hacia un objetivo de producción.

A partir de los datos obtenidos se harán las pruebas correspondientes de correlación de genotipo e indicadores fenotípicos, con la finalidad de seleccionar a aquellos individuos que dieron positivo al alelo B. Además, de realizar cruzas dirigidas para mejorar y perpetuar la estirpe aumentando la calidad de la leche y con ellos la producción de queso.

## LITERATURA CITADA

- Barker, A.C.M. y C. Manwell. 1980. Chemical classification of cattle. I breed groups. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.* 11: 127-150.
- Barroso, A; Dunner, S; Cañón, J. 1998. Technical note: Detection of Bovine Kappa-casein variants A, B, C, y E by Means of Polymerase Chain Reaction-single strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). *J. Anim. Sci.* 76:1535-1538.
- Benavides Castro, T.A. 2003. Efecto de las Variantes Genéticas A y B de  $\kappa$ -Caseína y  $\beta$ -lactoglobulina sobre las Propiedades de Coagulación de la Leche. Tesis de Licenciatura. Escuela de Ingeniería en Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Chile. Valdivia Chile.

- Bonvillani, A.G.; Di Renzo, M.A.; Tiranti, I.N. 2000. Genetic polymorphism of milk protein loci in Argentinian Holstein cattle. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 4, 819-823.
- Cervantes, P., M. Luna, M. Hernández, F. Perez-Gil, P. Ponce y O. Uffo. 2007. Polimorfismo genético de en el locus de la kappa-caseína, en vacas de diferentes razas y cruces en el trópico mexicano. *Rev. Salud Anim.* Vol. 29, No. 2, 78-84.
- Chen, S.Y., V. Costa, M. Azevedo, M. Baig, N. Malmakov, G. Luikart, G. Erhards and A. Beja-Pereira. 2008. New alleles of the bovine k-casein gene revealed by resequencing and halotype inference analysis. *J. Dairy Sci.* 91:3682-3686
- Corral, J. M., M. Izquierdo, S. Mateos, J.C. Parejo, J. Salazar, A. Rabasco, M. Martínez-Trancón, M. E. Sansinforiano, F. I. Hernández, J. González-Crespo, M.A. Jiménez-Hernándo, F. J. Portilla, J.A. Padilla. 2006. Asociación del polimorfismo del gen de la k-caseína (csn3) con la producción y composición de la leche en ovino merino. Disponible en: [www.aida-itea.org/jornada38/genetica/qtls\\_y\\_genes\\_candidatos\\_ii/qg\\_c9\\_corral.pdf](http://www.aida-itea.org/jornada38/genetica/qtls_y_genes_candidatos_ii/qg_c9_corral.pdf).
- Del Lama S.N. y M.A. Zago. 1996. Identification of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin genotypes in Brazilian *Bos indicus* and *Bubalus bubalis* population. *Braz. J. Genet* 19: 73-77.
- Formaggioni P, Summer A, Malacarne M, Mariani P. 1999. Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in bos genus. *Univ degli Studi di Parma An della Facoltà di Med Vet.* Disponible en: [www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/index2.htm](http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/index2.htm).
- Fox P. F., Guinee T. P, Cogan T. M., McSweeney P. L. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. 32-34
- Freyer G, Liu Z, Erhardt G, Panicke L. 1999. Casein polymorphism and relation between milk production traits. *J A Breed Gen.* 116:87-97.
- Golijow, C. D., Giovambattista G., Ripoli M.V., Dulout F.N. Lojo M.M. 1999. Genetic variability and population structure in loci related to milk production traits in native Argentine Creole and commercial Argentine Holstein cattle. *Braz. J. Genet*, 22: 395-398.
- Grosclaude F. 1988. Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relation avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait. *Inra Prod. Anim.* 1(1): 5-17.
- Gutiérrez A, B. Pintado, J. de la Fuente. 2000. Uso del polimorfismo genético de las lactoproteínas para mejorar la calidad de la producción lechera. *Boletín Anembe.* Disponible en: [www.anembe.com/revista/indice.cgi?folder=mar\\_abr\\_00](http://www.anembe.com/revista/indice.cgi?folder=mar_abr_00).
- Horne DS y Muir DD. 1994. Genetic polymorphism of  $\kappa$ -casein and rennet coagulation time. Effects of serum phase components. *Milchwissenschaft*; 49:446-449.
- Keating, A.F., P. Davoren, T.J. Sminth. R.P. Ross y M.T. Cairns. 2007. Bovine k-Casein Gene promoter haplotypes with potential implications for milk protein expression. *J. Dairy Sci.* 90:4092-4099.
- Kemenes P.A., L.C.A. Reginato, A.J.M. Rosa, I.V. Parker, G.A. Razook, L.A. Figueredo, N.A. Silva, M.A.L. Etchegaray y L.L. Coutinho. 1999.  $\kappa$ -casein,  $\beta$ -Lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzerá, Camcu, Charolais, Canchin an Santa Gertrudis cattle. *Genet. Mol. Biol.* 22: 539-541.

- López Benavides, M. 1998. Correlación entre la constitución genética kappa-caseína y características de producción en vacas Holstein de primer parto en la sabana Bogotá. Primer Simposio de Investigación en la Universidad de la Salle. Colombia.
- López R.E. y N. Vásquez. 2004. Determinación del sexo y genotipificación del gen de la  $\kappa$ -caseína en embriones bovinos. *Rev Col Cienc Pec.* 17(3): 231-240. Disponible en: [//kogi.udea.edu.co/revista/17/17-3-3.pdf](http://kogi.udea.edu.co/revista/17/17-3-3.pdf). Consultado en junio de 2010.
- McLean, D. M.; Graham, E. R. B.; Ponzoni, R. W. y McKenzie, H. 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J. Dairy Res.* 51:531-546.
- Medrano, J. F. y E. A. Córdova. 1990. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Bio/technology* 8: 144-146.
- Munizaga, F. G.; Barrales, V. L. y Valenzuela, A. L. 2004. Desarrollo de un modelo para evaluar la factibilidad productiva y económica de la progenie resultante del cruzamiento de vacas Holstein Friesian con toros de las razas francesas Montbeliarde y Normando. Departamento de Ciencias Animales, pontificia Universidad Católica de Chile.
- Ortega, L. y Ward R. 2005. El sistema de Ganadería de Doble Propósito: Un sistema eficiente. Facultad de Agronomía. Universidad de Zulia. Maracaibo-Venezuela. 22-26 pp.
- Osta R. 1994. Caracterización genética de proteínas lácteas y sexaje de embriones en ganado vacuno mediante la aplicación de la biotecnología al análisis del DNA. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.
- Requena, F.D., E.I. Agüera y F. Requena. 2007. Genética de la caseína de la leche en el bovino Frisón (Milk of casein of genetic in the Frison bovine). *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria.* VIII (1): 1695-7504.
- Tambasco M.D. 1998. Detecao de polymorphism dos genes de  $\kappa$ -casina,  $\beta$ -lactoglobulina em animais da raza Jersey. Monografía: Universidad Federal de Sao Carlos. S.P.
- Thompson A., Boland M., Singh H. 2009. Milk Proteins From Expression Food. *Food Science and Tecnology, International Series.* ELSEVIER. New Zeland. 1-19.
- Van-Eennaam A.L. y J.E. Medrano. 1991. Differences on allelic protein expression in the milk of heterozygous  $\kappa$ -casein cow's. *J Dairy Sci.* 74:1491-1496.
- Viana, J. L.; Fernández, A.; Iglesias, A.; Sánchez, L.; Becerra, J. 2001. Análisis de los genotipos más frecuentes de la kappa caseína en la raza vacuna rubia gallega mediante PCR/RFLPs. *Archivos de Zootecnia* 50:91-96.
- Voelker, G. R., G. T. Bleck y M. B. Wheeler. 1997. Single-base Polymorphisms within the flanking region of the bovine  $\alpha$ -lactalbumin gene. En: *J Dairy Sci.* Vol. 80; p.194-197.
- Zardowny D y U. Kühnlein. 1990. The identification of the  $\kappa$ -casein genotype in Holstein